

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Viktorija Tokić

SIGURNOSNI ASPEKTI PRIMJENE NANOFARMACEUTIKA U TRUDNOĆI I DOJENJU

Specijalistički rad

Zagreb, 2017.

PSS studij: Poslijediplomski specijalistički studij Klinička farmacija

Mentor rada: doc. dr. sc. Ivan Pepić

Specijalistički rad obranjen je dana 5.prosinca 2017. u 13h na Farmaceutsko- biokemijskom fakultetu

Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Vesna Bačić Vrca

2. Doc. dr. sc. Ivan Pepić

3. Dr. sc. Viktorija Erdeljić Turk

Rad ima 59 listova.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Ivana Pepića.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Glavni farmakoterapijski izazov tijekom trudnoće i dojenja je razviti sigurne i ciljane lijekove. Korištenje lijekova u trudnoći može dovesti do nepovoljnih učinaka za trudnicu i plod. Lijekovi primjenjeni oralno ili parenteralno u trudnica ulaze u sistemske cirkulaciju s mogućnošću prijenosa do ploda. Dugo se vjerovalo da je placenta barijera koja štiti plod od raznih vanjskih utjecaja, među ostalim i lijekova, no upravo je talidomidska katastrofa dokazala suprotno, a to je da lijekovi mogu uzrokovati oštećenje ploda, odnosno djelovati teratogeno. Unatoč riziku, postoji potreba za liječenjem genitalnih infekcija (npr. bakterije, gljivice, virusi), epilepsije, dijabetesa, astme i različitih stanja tijekom trudnoće. Male molekule (manje od 600 Da) prolaze placentu i dolaze do ploda pasivnom difuzijom, dok je prolaz velikih molekula >1000 Da ograničen, ovisno nalaze li se specifični receptori na površini sinciotrofoblast koji će omogućiti kretanje tako velikih molekula. Nanofarmaceutici i dalje su snažan čimbenik u unapređenju kliničke terapije. Međutim, potencijalna klinička primjena nanofarmaceutika nije dovoljno istražena u pogledu biodistribucije i sigurnosti tijekom trudnoće i dojenja.

Materijali i metode

Literatura je istraživana po bibliografskim bazama podataka (PubMed, ScienceDirect) prema ključnim riječima. Članci dobiveni pretraživanjem literature klasificirani su od općih prema specijaliziranim, pri čemu su relevantni članci odabrani i proučavani na analitičan i kritičan način. Najvažniji rezultati kao i vlastita razmišljanja su citirani u pregledu.

Rezultati

Prijenos nanočestica s majke na plod postao je predmet velikog interesa u procjeni njihove sigurnosti i eventualnog rizika na rast i razvoj malformacija u ploda. Mogući načini prijenosa nanočestica kroz placentu uključuju difuziju, vezikularni prijenos, prijenos preko transmembranskih proteina transportera i transtrofoblastičnog sustava kanala. Struktura placente, stanični sastav, funkcija i protok krvi mijenjaju se ovisno o gestacijskoj dobi što utječe na propusnost placente. Prijenos nanočestica će ovisiti o različitim fazama trudnoće. Sama placenta tijekom trudnoće prolazi kroz niz promjena koje dovode do promjena njene propusnosti. Na početku trudnoće placenta je zadebljala i smanjena joj je površina pa je samim tim teže propusna te na taj način štiti razvoj ploda, no u kasnijem stadiju trudnoće ona se stanjuje i povećava, zbog čega je povećana njena propusnost jer su i same potrebe za hranom ploda povećane. Veličina, površinski naboj i površinska svojstva nanočestica ključni su parametri koji utječu na placento-fetalni prijenos i biodistribuciju nanočestica.

Zaključak

Razvoj nove terapije zasnovane na nanočesticama u trudnoći i dojenju zahtjeva poznavanje puta prijenosa nanočestica kroz placentu. Za postizanje takvih saznanja bitno je razumjevanje kako značajke nanočestica poput veličine, oblika, naboja, kemijskog sastava i ciljajućih liganda utječu na akumulaciju, prijenos i biološki učinak što je ključno za razvoj novih sustava s ciljem liječenja majke, ploda ili poremećaja placente. Nanočestična terapija u trudnoći još nije uspostavljena. Međutim, izražena je klinička potreba za poboljšanim sustavima za isporuku lijeka koji bi bili visoke selektivnosti i istodobno sigurni za primjenu.

SUMMARY

Objectives

A major challenge in drug therapy is to develop safe and selective targeting strategies during pregnancy and lactation. Use of any drug during pregnancy is complicated by concerns of adverse effects on the pregnant woman and the fetus. Drugs administered orally or parenterally to the mother reach the systemic circulation and have a potential to pass to the fetus. The importance of the drugs transported from the mother to the fetus and its implications for the fetus were recognized by the teratogenic defects induced by thalidomide. In spite of the risk, there is a continuing need to receive medicines for genital infections (bacterial, yeast, viruses, etc.), epilepsy, diabetes, asthma and variety of other conditions during pregnancy. Small molecules (less than 600 Da) are known to transit the human placenta and reach the fetus by passive diffusion while the passage of substances of molecular weight >1000 Da may be restricted depending upon whether there are specific receptors on the surface of the syncytiotrophoblast to facilitate the movement of these large molecules. Nanodrugs continue to be a powerful factor in the advancement of clinical therapy. However, the potential clinical applications of nanodrugs warrant their investigation in terms of biodistribution and safety during pregnancy and lactation.

Material and methods

The literature was searched in bibliographic databases (PubMed, ScienceDirect) according to the primary keywords. Articles obtained by searching of the literature were classified from general to more specialized. Relevant articles are selected, and then examined in an analytical and critical way. The most important results, as well as own considerations are quoted in the overview.

Results

The materno-fetal transfer of nanomedicines has become of great interest in assessing their safety and the associated risk of growth and developmental defects in the fetus. Possible transport routes for nanoparticles across the placenta include diffusion, vesicular transport, transmembranal transporter proteins and the transtrophoblastic channel system. Placental structure, cellular composition, function and blood flow change with gestational age, which alters placental uptake and transport. Translocation of nanoparticles is likely to be dependent on the different stages of pregnancy. In the first trimester, the placental barrier is very thick in order to protect the developing embryo and becomes thin at term when substantial amounts of nutrients are required to sustain fetal growth. The size, surface charge and surface properties of nanoparticles is key parameters which influence placental/fetal penetration and biodistribution of nanoparticles. Besides understanding how nanoparticle characteristics influence placental transport, it will be essential to achieve a comprehensive insight into the mechanisms underlying this transfer.

Conclusion

The development of novel nanoparticle-based therapies in pregnancy and lactation requires an in-depth understanding of the mechanisms of placental nanoparticle transfer. Achieving a comprehensive understanding on how nanoparticle characteristics such as size, shape, charge, chemical composition and targeting ligands impact on placental accumulation, translocation and biological effects is central to the development of new drug-delivery systems with the objective to preferentially treat the mother, the fetus or placental disorders. In pregnancy, no nanomedical therapies have yet been established; however, the clinical need for improved drug delivery systems with high selectivity and safety is tremendous.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. ANATOMSKE I FIZIOLOŠKE PROMJENE U TRUDNOĆI	1
1.2. LIJEKOVI TIJEKOM TRUDNOĆE	3
1.3. FARMAKOKINETIKA LIJEKA U TRUDNOĆI	7
1.4. FARMAKODINAMIKA LIJEKA U TRUDNOĆI	9
1.5. UČINAK LIJEKA NA PRENATALNE RAZVOJNE FAZE	10
1.6. DOJENJE I LIJEKOVI MAJKE	11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	16
3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI	17
3.1. PLACENTARNI TRANSPORTNI MEHANIZMI.....	17
3.1.1. Jednostavna difuzija	20
3.1.2. Transcelularni prijenos	20
3.1.3. Endocitoza i egzocitoza	22
3.1.4. Transporteri lijekova u ljudskoj krvno-placentarnoj barijeri	22
3.2. ČIMBENICI KOJI KONTROLIRAJU PRIJENOS LIJEKOVA U MLIJEKO	25
3.2.1. Fiziologija dojke	25
3.2.2. Puferski sustavi	26
3.2.3. Proteini	27
3.2.4. Lipidi	27
3.2.5. Razlike u sastavu mlijeka	28
3.3. DIZAJN I RAZVOJ LIJEKOVA U TRUDNOĆI.....	30
3.4. FUNKCIJA PLACENTE I RAZVOJ LIJEKOVA	31
3.5. MODELI PLACENTARNOG PRIJENOSA - MOGU LI SE PRIMJENITI NA STUDIJE PRIJENOSA NANOČESTICA?	32
3.5.1. <i>In vitro</i> modeli placente.....	32
3.5.2. <i>Ex vivo</i> modeli placente	34
3.5.3. <i>In vivo</i> animalni modeli.....	35

3.6. TRANSPLACENTARNI PRIJENOS NANOMATERIJALA	36
3.6.1. Utjecaj veličine nanočestica na placentarni prijenos	37
3.6.2. Utjecaj površinskog naboja nanočestica na placentarni prijenos	40
3.6.3. Utjecaj oblika nanočestica na prijenos preko barijere placente	42
3.6.4. Nanočestice koje ne prolaze barijeru placente i ne nakupljaju se u tkivu fetusa	42
3.7. MODELI ZA PREDVIĐANJE PRIJENOSA NANOČESTICA U LJUDSKO MLIJEKO	44
3.7.1. <i>In vitro</i> modeli za određivanje M/P omjera	44
3.7.2. Modeli temeljeni na stanicama	46
3.7.3. <i>In vivo</i> animalni modeli.....	46
3.7.4. Modeli izloženosti.....	47
3.7.5. Prijenos nanočestica u mlijeko	47
4. RASPRAVA.....	48
5. ZAKLJUČAK	52
6. LITERATURA	53
7. ŽIVOTOPIS	59

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. ANATOMSKE I FIZIOLOŠKE PROMJENE U TRUDNOĆI

Tijekom trudnoće dolazi do brojnih anatomskih promjena koje mogu mijenjati tijek bolesti, odnosno farmakokinetiku i farmakodinamiku. Povećanjem veličine maternice povećava se i pritisak krvnih žila na tkiva unutar i ispod zdjelice, što često dovodi do edema donjih ekstremiteta, varikoziteta i venskog zastoja, čime se povećava rizik od tromboembolije. Procijenjuje se da gotovo sve žene tijekom trudnoće dožive neki stupanj mišićno-koštanih bolova čime se povećava potreba za analgeticima (Malek i Mattison, 2010).

Promjene u kardiovaskularom sustavu počinju u prvom tjednu trudnoće, a nastavljaju se tijekom i nakon trudnoće. Srčani minutni volumen povećava se s 5 na 7,5 l/min, udarni volumen se povećava sa 65 na 85 ml, a otkucaji srca sa 75 na 87 otkucaja u minuti. Tijekom zadnje polovice trudnoće minutni volumen srca je osjetljiv na položaj majke, pa će se minutni volumen smanjivati kod stajanja ili ležanja. Tijekom trudnoće krvni tlak pada, dok se u trećem trimestru povećava. Specifične hemodinamične promijene u stanju trudnoće su smanjenje krvnog otpora i krvnog tlaka, povećanje minutnog volumena srca, povećanje kapaciteta krvi, volumena krvi i povećanje stimulacije renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava. Takve promjene koje se događaju utječu na dijagnozu i terapiju i onemogućuju razlikovanje kronične hipertenzije i trudnoćom uzrokovane hipertenzije i preeklampsije (Malek i Mattison, 2010).

Volumen krvi se povećava oko 1500 ml u jednoplodnoj trudnoći i 3000 ml kod blizanačke trudnoće. Volumen crvenih krvnih stanica poveća se 400 ml kod jednoplodne trudnoće, a 500 ml kod blizanačke trudnoće. Volumen plazme se poveća više u odnosu na volumen crvenih krvnih stanica što dovodi do "fiziološke anemije" tijekom trudnoće, stoga je potrebno uvođenje nadomjesnog željeza. Trudnoća je povezana s hiperkoagulacijom zbog povećanja razine faktora zgrušavanja VII, VIII i X te von Willebrandovog faktora, kao i fibrinogena. Hiperkoagulacija zajedno sa smanjenom venskom cirkulacijom u donjim udovima, progesteronom posredovanim venskim zastojem i smanjenim kretanjem, povećava rizik arterijske tromboze približno za tri puta, a venske tromboembolije četiri

puta. Rizične trudnice su na antikoagulacijskoj terapiji. Antikoagulacijski lijek izbora je heparin; ima najmanje izraženu toksičnost za plod, dok kod majke može izazvati osteopeniju. Oralni antikoagulansi su isključeni zbog značajnog rizika za razvoj toksičnosti ploda. Budući su u trudnoći primjećene značajne promjene u farmakokinetici antikoagulansa, bitno je nadzirati terapijsku učinkovitost i prilagoditi dozu za postizanje terapijskih ciljeva (Malek i Mattison, 2010).

Funkcija pluća se mijenja dijelom zbog povišenja progesterona, a dijelom stoga što povećana maternica ometa širenje pluća. Progesteron javlja mozgu da snižava razinu CO_2 . Da bi se razina CO_2 snizila, minutni volumen i frekvencija disanja se povećavaju, što povećava pH plazme. Potrošnja O_2 se povećava za oko 20% kako bi zadovoljile povećane metaboličke potrebe fetusa, placente i majčinih organa. Inspiratorna i ekspiratorna rezerva, rezidualni volumen i kapacitet te pH plazme se smanjuju. Takve plućne promjene važne su kod astme; približno kod 20% trudnica propisuju se respiratorni lijekovi tijekom trudnoće, u usporedbi s oko 10% prije trudnoće. Oko 8% trudnica ima astmu, a one s teškom astmom mogu obično doživjeti pogoršanje. Terapija astme uključuje: samokontrolu i korištenje kortikosteroida kako bi se spriječila ili smanjila upala, uz bronhodilatatore po potrebi. Neadekvatno liječena astma ima ozbiljne posljedice za majku i plod. Učinkovita kontrola i liječenje astme također nosi rizik za toksičnost u razvoju, ali je sigurnija od neadekvatnog liječenja. Lijekovi za astmu također mogu mijenjati strukturu i funkciju placente. U trudnoći se mijenja farmakokinetika kortikosteroida koji se koriste u liječenju astme. Tijekom trudnoće, povećan je protok krvi, nastaje edem u gornjim dišnim putovima, osobito nosu, zbog čega se javlja trudnički rinitis u otprilike svake pete žene. Začepljenje nosa za vrijeme trudnoće može dovesti do povećanja disanja na usta, hrkanja i apneje za vrijeme spavanja. Kod žena s nosnom kongestijom i apnejom veća je vjerojatnost razvoja hipertenzije i zastoja rasta ploda. Respiratorni lijekovi koji se koriste u trudnoći nose rizik za placentu i plod. Međutim, ispiranje slanom vodom može biti učinkovito kao i primjena dekongestiva (Malek i Mattison, 2010).

Promjene probavnog sustava tijekom trudnoće važne su zbog utjecaja na bioraspoloživost, metabolizam, apsorpciju i izlučivanje lijekova. Promjene probavnog sustava uključuju povećanje pH zbog smanjenog lučenja kiseline i odgođeno pražnjenje želuca. Osim toga, progesteron smanjuje motilitet crijeva i tonus sfinktera. Takve gastrointestinalne promijene povezane su sa žgaravicom,

mučninom i povraćanjem i javljaju se na početku trudnoće. Pored mučnine, žgaravica i refluks su česti tijekom trudnoće, a obično su posljedica smanjenog tonusa sfinktera ili infekcije bakterijom *Helicobacter pylori*. Liječenje tijekom trudnoće počinje s prehrambenim promjenama i promjenama u načinu života. Savjetuju se češći i manji obroci te promijena hrane koja se jede prije spavanja. Ako te promjene nisu dovoljne, povremena uporaba antacida može biti od pomoći. Za žene koje ne reagiraju na antacide, ranitidin je sljedeći izbor, osobito s obzirom na kliničke podatke koji pokazuju učinkovitost u trudnoći (Malek i Mattison, 2010).

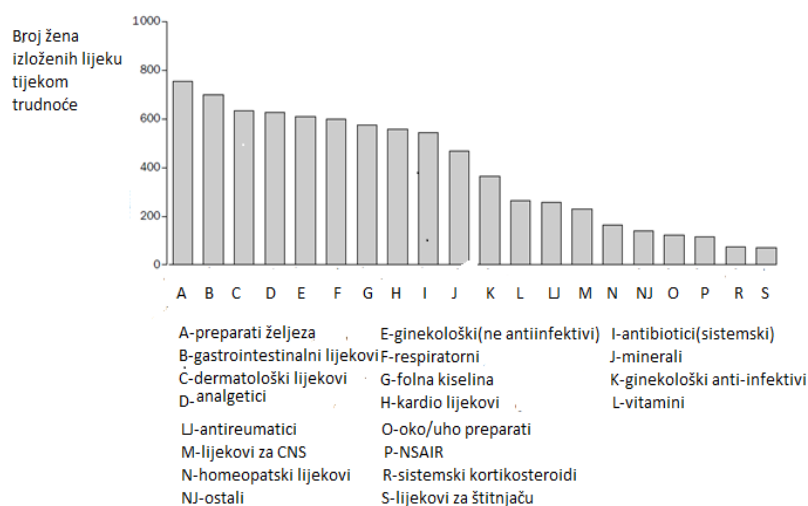
Bubrežne promjene u trudnoći glavni su uzrok promjena u farmakokinetici lijeka tijekom trudnoće. Povećava se protok krvi kroz bubrege, povećava se glomerularna filtracija, a i veličina bubrega. Povećanjem bubrežnog krvotoka i glomerularne filtracije 50% se povećava klirens za lijekove koji se ne izlučuju ili resorbiraju renalnim tubulima. Farmakokinetičke promijene mijenjaju učinkovitost lijeka, što ukazuje na potrebu da se poveća doza ili smanji interval doziranja (Malek i Mattison, 2010).

1.2. LIJEKOVI TIJEKOM TRUDNOĆE

Gotovo polovica žena koristi bar jedan lijek tijekom trudnoće (Andrade i sur., 2004; Axelsdottir i sur., 2014; Malm i sur., 2003). Primjerice, slikom 1 prikazane su najčešće skupine lijekova koji se primjenjuju tijekom trudnoće na području Francuske, dok tablica 1. daje pregled takvih lijekova na području SAD-a. Moguće je opaziti značajne razlike između zemalja po vrstama lijekova koje se koriste tijekom trudnoće. U tom smislu tablica 1. pregledno prikazuje najčešće bezreceptne lijekove koji se primjenjuju tijekom trudnoće, a uzimajući u obzir 6 različitih regija (Lupattelli i sur., 2014). Uporaba lijekova tijekom rane trudnoće i uporaba lijeka 6 mjeseci prije trudnoće povezana je s nepovoljnim društvenim položajima i niskim socijalnim statusom. Uporaba lijekova u samoliječenju je smanjena, dok je primjena lijekova propisanih na recept povećana (Axelsdottir i sur., 2014). Međutim edukacijski programi usmjereni prema trudnicama povećavaju svijest o lijekovima i važnosti savjetovanja sa zdravstvenim djelatnicima prije primjene bilo kakvog lijeka (Zaki i Albarraq, 2014). Tijekom trudnoće žene su dosta skeptične prema lijekovima, a što je potrebno znati pri propisivanju lijekova. Iz etičkih razloga sve trudnice su isključene iz kliničkih ispitivanja. Umjesto toga, procijena sigurnosti lijeka ovisi o opservacijskim studijama ili velikoj retrospektivnoj kohortnoj studiji (Axelsdottir i sur., 2014).

Zabilježeno je korištenje velikog broja lijekova tijekom trudnoće s potencijalnim rizikom za fetus, informacije je li lijek dovoljno učinkovit i u kojoj dozi nisu osigurane. Takva usmjerenost na rizik za fetus bez gledanja na terapijsku učinkovitost je konstantna tema farmakoepidemioloških studija o lijekovima tijekom trudnoće (Malek i Mattison, 2010).

U svrhu pružanja što kvalitetnijeg stručnog savjeta Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) razvila je sustav označavanja s obzirom na rizik uzimanja u trudnoći, a takva se klasifikacija primjenjuje i kod nas u Hrvatskoj. Lijekovi su razvrstani u pet skupina označenih slovima A, B, C, D i X (tablica 2). U skupini A nalaze se lijekovi koji se smatraju sigurnima za primjenu u trudnoći, dok je primjena lijekova skupine X u trudnoći kontraindicirana zbog dokazane teratogenosti.



Slika 1. Najčešće skupine lijekova koji se primjenjuju tijekom trudnoće na području Francuske (prilagođeno prema Lacroix i sur., 2000).

Tablica 1. Najčešći bezreceptni lijekovi koji se primjenjuju tijekom trudnoće, a uzimajući u obzir sličnosti i razlike na područjima 6 različitih regija (Lupattelli i sur., 2014)							
Upotreba OTC lijekova tijekom trudnoće po ATC kriteriju , indikacije i regije (n=9459)*+							
Upotreba OTC lijekova sveukupno i po skupinama lijekova	REGIJE (n=9459)*+						
	Zapadna Europa n=3201 n (%)	Sjeverna Europa n=2820 n (%)	Istočna Europa n=2342 n (%)	Sjeverna Amerika n=533 n (%)	Južna Amerika n=346 n (%)	Australija n=217 n (%)	Ukupno n=9459 n (%)
OTC lijekovi protiv bolova (sveukupno)	1714 (53.5)	1773 (62.9)	734 (31.3)	284 (53.3)	127 (36.7)	151 (69.9)	4783 (50.6)
Po skupini lijekova:							
<i>Paracetamol</i> (uključujući kombinacije) (N02BE)	1655 (51.7)	1735 (61.5)	630 (26.9)	263 (49.3)	87 (25.1)	146 (67.3)	4516 (47.7)
<i>NSAID</i> (M01A)	70 (2.2)	182 (6.5)	68 (2.9)	40 (7.5)	59 (17.1)	7 (3.2)	426 (4.5)
<i>Acetilsalicilna kiselina</i> (uključujući kombinacije) (N02BA)	7 (0.2)	11 (0.4)	32 (1.4)	2 (0.4)	2 (0.6)	1 (0.5)	55 (0.6)
<i>Metamizol</i> (N02BB02)	---	6 (0.2)	31 (1.3)	1 (0.2)	12 (3.5)	---	50 (0.5)
OTC antacidi (sveukupno)	1011 (31.6)	883 (31.3)	583 (24.9)	129 (24.2)	48 (13.9)	76 (35.0)	2730 (28.9)
Po skupini lijekova:							
<i>Antacidi</i>	472 (14.7)	550 (19.5)	508 (21.7)	47 (8.8)	36 (10.4)	54 (24.9)	1667 (17.6)
<i>Kompleks alginatne kiseline / sukralfat/ bismut</i> (A02BX)	606 (18.9)	421 (14.9)	87 (3.7)	4 (0.8)	1 (0.3)	17 (7.8)	1136 (12.0)
<i>Antagonisti H2 receptora</i> (A02BA)	20 (0.6)	20 (0.7)	16 (0.7)	57 (10.1)	10 (2.9)	17 (7.8)	137 (1.4)
<i>Antacidi kalcijem</i> (A02AC)	23 (0.7)	12 (0.4)	10 (0.4)	69 (12.9)	2 (0.6)	10 (4.6)	126 (1.3)
<i>IPP</i> (A02BC)	38 (1.2)	52 (1.8)	---	10 (1.9)	2 (0.6)	5 (0.3)	107 (1.1)
OTC sprej/kapi za nos (sveukupno)	272 (8.5)	742 (26.3)	451 (19.3)	35 (6.6)	7 (2.0)	14 (6.5)	1521 (16.1)
Po skupini lijekova:							
<i>Dekongestivi</i>	204 (6.4)	683 (24.2)	365 (15.6)	20 (3.8)	3 (0.9)	4 (1.8)	1279 (13.5)
<i>Nosni kortikosteroidi</i> (R01AD)	31 (1.09)	49 (1.7)	12 (0.5)	5 (0.9)	2 (0.6)	10 (4.6)	109 (1.2)
<i>Imuno stimulansi za nos</i> (L03A)	---	---	28 (1.2)	---	---	---	28 (0.3)
OTC Laksativi (sveukupno)	240 (7.5)	227 (8.0)	237 (10.1)	50 (9.4)	8 (2.3)	19 (8.8)	781 (8.3)
Po skupini lijekova:							
<i>Osmotski laksativi</i> (A06AD)	159 (5.0)	171 (6.1)	197 (8.4)	2 (0.4)	2 (0.6)	8 (3.7)	539 (5.7)
<i>Kemijski</i>							

laksativi (A06AB)	28 (0.9)	44(1.6)	18 (0.8)	7 (1.3)	6 (1.7)	2 (0.9)	105 (1.1)
Klistir (A06AG)							
Emolijensi (A06AA)	3 (0.1)	25 (0.9)	34 (1.5)	4(0.8)	---	2 (0.9)	68 (0.7)
	8 (0.2)	---	---	38 (7.1)	---	6 (2.8)	52 (0.5)
OTC antiemetici (sveukupno)	263 (8.2)	273 (9.7)	41 (1.8)	60 (11.3)	28 (8.1)	40 (18.4)	705 (7.5)
Po skupini lijekova:							
1. gen. Anti- Histaminika (R06A)	141 (4.4)	256 (9.1)	7 (1.5)	55 (10.3)	5 (1.4)	5 (2.3)	469 (5.0)
Metoklopramid Domperidon/ Bromoprid (A03FA)	113 (3.5)	5 (0.2)	18 (0.8)	2 (0.4)	19 (5.5)	27 (12.4)	184 (1.9)
UKUPNA PRIMJENA OTC LIJEKOVA	2163 (67.6)	2155 (76.4)	1347 (57.5)	342 (64.2)	156 (45.1)	168 (77.4)	6331 (66.9)
<p>* Države su grupirane u regije kao što je prikazano u tablici 1.</p> <p>+ Sveukupni postotak se ne dodaje sveukupnoj upotrebi lijekova jer su prikazane samo najčešće skupine lijekova. Stope ne uključuju mineralne suplemente, vitamine, željezo i biljne i komplementarne lijekove. Procjene ukupne upotrebe glavnih OTC skupina su prikazane podebljano.</p> <p>ATC – Anatomical Therapeutic Chemical; OTC – over-the-counter medications.</p>							

Tablica 2. Klasifikacija rizika za primjenu lijekova u trudnoći prema američkoj Agenciji za hranu i lijekove (FDA) (prilagođeno prema (Bernick i Kane, 2012).

Kategorija rizika	Definicija kategorija rizika
A	Kontrolirana ispitivanja u žena nisu pokazala fetalni rizik.
B	Ne postoje dokazi rizika u ljudi. Ispitivanja na animalnom modelu nisu pokazala fetalni rizik. Kontrolirana ispitivanja u žena nisu provedena.
C	Rizik nije moguće isključiti. Ispitivanja na animalnom modelu pokazuju teratogenost ili nema podataka. Kontrolirana ispitivanja u žena nisu provedena. Lijek je moguće primijeniti ako potencijalna korist opravdava mogući fetalni rizik.
D	Postoje dokazi humanog fetalnog rizika. Korist primjene lijeka može opravdati mogući rizik (vitalne indikacije, teške bolesti za koje nema alternativnog lijeka pri čemu sama bolest ima veću učestalost malformacija).
X	Apsolutno kontraindicirani. Ispitivanja na animalnim i humanim modelima pokazuju teratogeni učinak lijeka. Rizik primjene ne opravdava moguću korist.

1.3. FARMAKOKINETIKA LIJEKA U TRUDNOĆI

Fiziološke promijene u trudnoći mogu dovesti do promijena u farmakokinetici lijekova. Farmakokinetičke promijene lijeka mogu se pojaviti zbog promijenjene apsorpcije, raspodjele, metabolizma i izlučivanja lijeka. Glavne fiziološke promjene u trudnoći koje značajno utječu na farmakokinetički profil lijeka prikazane su tablicom 3, dok su tablicom 4. prikazani glavni čimbenici koji utječu na prijenos lijeka kroz placentu i učinak lijeka na fetus.

Tablica 3. Pregledni prikaz glavnih fizioloških promjena u trudnoći koje značajno utječu na farmakokinetički profil lijeka (prilagođeno prema Shaikh i Kulkarni, 2013).

Fiziološke promijene u trudnoći	
Apsorpcija	Povećanjem razine progesterona u krvotoku smanjuje se pražnjenje želuca što može smanjiti vrijeme postizanja maksimalne koncentracije i maksimalnu koncentraciju lijeka u plazmi. U slučaju kada je potrebno postizanje brzog terapijskog odgovora lijek se primjenjuje parenteralno.
Raspodjela	Trudnoću prati povećanje volumena vode na 8 litara i povećanje volumena plazme za 30% s posljedičnim smanjenjem koncentracije albumina. To utječe na volumen raspodjele i na koncentraciju lijeka u plazmi.
Metabolizam	Jetreni enzimi su inducirani u trudnoći, najvjerojatnije zbog visoke koncentracije cirkulirajućeg progesterona. Uslijed toga je ubrzana metabolička razgradnja, pogotovo lipofilnih lijekova.
Izlučivanje	Tijekom trudnoće dolazi do povećanja glomerularne filtracije za 70% zbog čega dolazi do bržeg smanjenja koncentracije lijekova koji se izlučuju putem bubrega. Primjerice, dozu amoksicilina treba udvostručiti za liječenje sustavnih infekcija, dok kod urinarnih infekcija nije potrebno zbog visoke koncentracije amoksicilina u mokraći.

Tablica 4. Glavni čimbenici koji utječu na prijenos lijeka kroz placentu i učinak lijeka na fetus (prilagođeno prema Shaikh i Kulkarni, 2013).

Fizikičko-kemijske značajke lijeka	Lipofilnost: što je lijek lipofilniji lakše će prolaziti kroz placentu, dok lijek koji je više ioniziran sporije prolazi placentnu barijeru i postiže nisku koncentraciju u fetusu.
	Veličina molekule: lijekovi male molekulske mase lagano prolaze kroz placentu.
Količina lijeka koja preko placente dospije do fetusa	Placentarni transporteri: iznose lijek iz fetalnog krvotoka u majčinu krv; primjerice, P-gp, BCRP, MRP3.
	Vezanje na proteine: može utjecati na obim i količinu prijenosa.
	Placentarni metabolizam: može pretvarati toksične lijekove u netoksične i obratno.
Trajanje izloženosti lijeku	Faza razvoja placente i fetusa u vrijeme izloženosti lijeku.
Fetalni farmakokintički profil lijeka	Fetalna jetra može smanjiti količinu lijeka u fetalnom krvotoku. Značajke raspodjele lijeka u različitim fetalnim tkivima.

1.4. FARMAKODINAMIKA LIJEKA U TRUDNOĆI

Pregledni prikaz glavnih farmakodinamskih promjena lijeka u trudnoći prikazuje tablica 5.

Tablica 5. Pregledni prikaz glavnih promjena farmakodinamskog profila lijeka u trudnoći (prilagođeno prema Shaikh i Kulkarni, 2013).

Utjecaj trudnoće	Učinci lijekova na reproduktivna tkiva (dojke, maternicu i slično) mogu ponekad biti izmijenjeni; međutim, utjecaj na druga majčina tkiva (srce, pluća, bubreg, središnji živčani sustav i sl.) ne mijenjaju se značajno u trudnoći, iako se fiziološki kontekst može mijenjati.
Terapijski učinak lijeka na fetus	Fetus može biti cilj liječenja; primjerice, kortikosteroidi se koriste za sazrijevanje pluća kada se očekuje prijevremen porod ili primjena fenobarbitona majkama blizu termina može prevenirati nastanak žutice.
Predvidljivi toksični učinak lijeka	Korištenje ACE inhibitora tijekom trudnoće može uzrokovati nepovratno oštećenje bubrega uslijed fetalne hipotenzije.
Teratogeni učinak lijeka	Lijekovi mogu ometati prolaz O ₂ ili hranjivih tvari kroz placentu i stoga imaju utjecaj na tkiva fetusa izražene metaboličke aktivnosti; primjerice, talidomid, vitamin A analozi ili nedostatak folne kiseline.

1.5. UČINAK LIJEKA NA PRENATALNE RAZVOJNE FAZE

Prenatalni razvoj možemo podijeliti u tri faze:

- Faza blastogeneze (prije implatacije) traje do 14. dana nakon oplodnje.
- Faza embriogeneze ili organogeneze traje 18.-60. dana nakon oplodnje.
- Faza rasta i dozrijevanja ploda do porođaja.

Lijekovi mogu zbog prolaska kroz placentu uzrokovati oštećenja fetusa. Bitno je razdoblje u kojem je plod bio izlagan lijeku. Ako su učinci lijeka bili štetni onda će vrsta oštećenja ovisiti o organu koji se u tom periodu najintenzivnije razvijao.

Izlaganje lijekovima tijekom faze blastogeneze odvija se po principu „sve ili ništa“, dovodeći do smrti ili do oporavka i normalnog razvoja.

Izlaganje lijekovima u fazi embriogeneze ili organogeneze može dovesti do funkcionalnih ili strukturnih oštećenja ploda, a teža oštećenja uzrokuju pobačaj. Najkritičniji period uzimanja štetnih tvari je između 33. i 45. dana od posljednje menstruacije.

Izlaganje lijekovima u periodu rasta i dozrijevanja ploda mogu dovesti do oštećenja razvoja i funkcije organa ploda, oštećenje se može javiti na središnjem živčanom sustavu, spolnim organima, imunom i koštanom sustavu.

Osnovno pravilo je kad god je moguće izbjeći davanje lijekova u prvom trimestru.

Teratogeneza je definirana kao strukturni ili funkcionalni poremećaj razvoja fetalnih organa, a može se očitovati kao poremećaj u rastu ili smrti fetusa, karcinogenezi te većoj i manjoj malformaciji (Francetić i Vitezić, 2014).

1.6. DOJENJE I LIJEKOVI MAJKE

Dojilje mogu biti izložene lijekovima ili drugim medicinskim sredstvima kraći ili duži period ovisno radi li se o akutnoj ili kroničnoj terapiji. Prednosti dojenja nadmašuju rizik izloženosti većini lijekova putem majčinog mlijeka, jer je samo mali broj lijekova kontraindiciran u dojilja ili je povezan sa štetnim učincima na dojenče. Iako većina lijekova i medicinskih sredstava ne predstavljaju rizik za majku ili dojenče, pažljiva ocjena omjera individualni rizik / korist nužna je kod nekih lijekova, posebno onih koji su koncentrirani u majčinom mlijeku ili dovode do klinički značajne izloženosti djeteta temeljem relativne doze novorođenčadi ili detektirane serumske koncentracije. Oprez se također preporuča kod lijekova s nedokazanom učinkovitošću, s dugim vremenom polueliminacije koje može dovesti do akumulacije lijeka ili s poznatom toksičnošću za majku ili dijete. Osim toga, posebno djeca mogu biti osjetljivija na nuspojave zbog nezrele funkcije organa (npr. nedonoščad ili novorođenčad). U procjeni rizika i koristi dojenja, zdravstveni djelatnici trebaju uzeti u obzir više čimbenika (Sachs i Droge, 2013).

Općenito se lijekovi koji su dopušteni u trudnoći, mogu uzimati i tijekom dojenja. Ako je lijek relativno neškodljiv, treba ga uzeti 30-60 minuta nakon dojenja i tri do četiri sata prije sljedećega dojenja. U većoj će mjeri u majčino mlijeko prelaziti lijekovi sljedećih značajki neionizirani, nevezani na proteine, male molekularne mase, visoke topljivosti u mastima i slabe baze. U majčinom mlijeku nakupljaju se liposolubilni i alkalni lijekovi. Pri propisivanju lijeka u dojilje treba birati lijekove kratkog vremena polueliminacije, lijekove koji se u visokom postotku vežu na proteine plazme, slabe peroralne bioraspoloživosti i velike molekularne mase (Francetić i Vitezić, 2014).

Rizik primjene lijekova za majke i dojenju novorođenčad je često pitanje zdravstvenim djelatnicima. Odgovor ovisi o nizu čimbenika koji uključuju dijete (uključujući gestacijsku dob pri rođenju, trenutnu dob, težinu, hranjenje, ukupni oralni unos, izloženost oralnoj apsorpciji od strane dojenog djeteta) i majku (kao što su doze lijekova i doziranje, put primjene, apsorpcija lijeka, vršne koncentracije u plazmi i vrijeme postizanja takvih vršnih koncentracija, volumen raspodjele, veličina molekule lijeka, stupanj ionizacije, pH, topljivost u vodi ili mastima, stupanj u kojem se lijek veže na proteine i oralna bioraspoloživost, količina lijeka koja se izlučuje u majčino mlijeko, potencijalni učinci lijeka na

proizvodnju mlijeka). Starost djeteta je također važan čimbenik u procesu donošenja odluka jer se štetni događaji povezani s izlaganjem lijekovima putem dojenja javljaju najčešće kod novorođenčadi mlađe od 2 mjeseca, a rijetko u djece starije od 6 mjeseci. Lijekovi najčešće pasivnom difuzijom prolaze iz sistemske cirkulacije majke u mlijeko, iako je moguć prijenos aktivnom difuzijom (Šejh i Kulkarni, 2013; Malek i Mattison 2010).

Tablica 6. Primjeri dojenačkih nuspojava lijekova koje je majka primjenjivala tijekom dojenja (Ito i Lee, 2003).

Lijek	Nuspojave
Atenolol	bradikardija
Kofein	nesanica, razdražljivost
Kokain	ozbiljna razdražljivost
Ergotamin	povraćanje/proljev
Doksepin	slabije sisanje i gutanje, hipotonija, povraćanje, razdražljivost
Fluoksetin	razdražljivost, slabi porast težine
Nikotin	šok, povraćanje
Fenobarbiton	sedacija
Salicilat	metabolička acidoza
Teofilin	razdražljivost

Razina lijeka u sistemske cirkulaciji majke važan je čimbenik koji utječe na prijenos i koncentraciju lijeka u majčinom mlijeku. Lijekovi izraženog obima vezanja za proteine plazme imaju malu vjerojatnost prijenosa iz majčine cirkulacije u mlijeko. Omjer koncentracije lijeka u mlijeku, u odnosu na koncentraciju lijeka u plazmi majke naziva se omjer mlijeko (M) / plazma (P) koncentracije lijeka. Visoki M/P omjer ukazuje na veću koncentraciju lijeka u majčinom mlijeku. Budući da se taj omjer mijenja tijekom vremena, vremenski prosjek omjera bi trebao biti korišten za određivanje kinetike lijeka, osim ako su poznate koncentracije u majčinom mlijeku paralelne onima u plazmi majke. Korisnost je ograničena u slučajevima kada se M/P omjer dobiva iz podataka u jednoj vremenskoj točki, naročito na kraju intervala doziranja, a takav odnos često je zbunjujući jer se značajno razlikuje od vremenski prosječne vrijednosti. Većina lijekova za koje su dostupni podaci imaju M/P omjer 1 ili manji od 1; oko 25 posto lijekova ima M/P omjer viši od 1, a oko 15 posto ih ima M/P omjere više od 2. Iako je M/P omjer koristan za razumijevanje količine lijeka u majčinom mlijeku, njegova važnost je često prenaplaćena. Na primjer, omjer viši od 1 ukazuje na to da je lijek koncentriran u majčinom mlijeku, ali ove informacije mogu biti klinički nevažne. Ako je količina lijeka koju dijete primi po jedinici vremena znatno niža nego što je potrebno u terapijske svrhe, razina izloženosti može se

smatrati niskom, bez obzira na M/P omjer. Prema tome, uspoređujući M/P omjere i koncentracije lijeka u plazmi majke bez procjene drugih čimbenika klinički je beznačajno (Ito, 2000).

Određivanje relativne doze za dojenčad (RID) koristi se kako bi se standardizirao način koji procjenjuje količinu primjenjenog lijeka koju dijete prima, a prema jednadžbi:

$$RID(\%) = \frac{\text{apsolutna doza za novorođenče } (\frac{mg}{kg} \text{ po danu)}}{\text{doza lijeka u majke } (\frac{mg}{kg} \text{ po danu} \times 100)}$$

Izračuni uključuju prosjek metabolizma i majčinu dozu u uobičajenom terapijskom rasponu. Prihvatljiva vrijednost RID je 10% ili manje za terminsko dojenče, čiji je klirens kapaciteta 1/3 odrasle osobe. Nedonoščad ima manji kapacitet klirensa lijekova sa samo 5% kapaciteta odrasle osobe u razdoblju od 24. do 28. tjedna trudnoće, a samo 10% u razdoblju od 28. do 34. tjedna trudnoće. RID je dostupan za mnoge lijekove iz referentnih baza podataka, kao što su Knjižnica Medicinske banke podataka javno dostupna preko mrežne stranice <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?LACT~~pobj> (Lawrence i Lawrence, 2011). Više informacija je sada dostupno na internetu i preko aplikacija za mobilne uređaje, primjerice baza LactMed (<http://toxnet.nlm.nih.gov>) (slika 2). Stoga, uz izuzetak radiofarmaceutika koji zahtijevaju privremeni prestanak dojenja, čitatelji će biti upućeni preko baze LactMed o najnovijim podacima o pojedinom lijeku. Baza LactMed uključuje najnovije informacije o koncentracijama lijeka u majčinom mlijeku i serumu dojenčadi, mogućim negativnim učincima na dojenje, potencijalnih učinaka na dojenje i preporuke za moguće alternativne lijekove koje treba uzeti u obzir. Dodaci prehrani su također uključeni. Iz tog razloga, uz izuzetak radiofarmaceutika koji zahtijevaju privremeni ili trajni prestanak dojenja, čitatelj će preko baze LactMed dobiti najnovije podatke o pojedinom lijeku (Sachs i Drugs, 2013).

Slika 2. Monografski prikaz baze LactMed (Sachs i Drugs, 2013).

LactMed je dio National Library of Medicine Toxicology Data Network (TOXNET)

Svaki navod uključuje slijedeće informacije:

- generički naziv
- znanstveni naziv: rod i vrsta biljke
- sažetak o korištenju kod dojenja (uključujući oprečne preporuke)
- razina lijeka: razina u majke (bazirana na studijama u kojima se mjerila konc. lijeka) i razina lijeka u dojenčeta (konc. u serumu i urinu iz literature)
- učinak na dojenče: po*Naranjo skali vjerojatnosti nuspojava se definira kao sigurna, vjerojatna, moguća i nesigurna
- mogući učinak na laktaciju ako je poznat
- alterativni lijek
- reference
- registarski broj kemijskog sažetka
- kategorija lijeka
- LactMed broj navoda
- datum zadnje revizije.

*Naranjo skala vjerojatnosti je metod procijene da je neželjena reakcija uzrokovana lijekom.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ljudska placenta je organ s višestrukim fiziološkim funkcijama, čini barijeru između majčinog i fetalnog krvotoka. Placenta ne pruža apsolutnu zaštitu fetusa, iako se to dugo vjerovalo. Od talidomidske katastrofe 1960-ih, ako ne i ranije, unaprijeđena je svijest o potencijalnoj štetnosti lijekova. Prijenos preko placente opisan je za dosta lijekova. Nanomaterijali nisu iznimka, a nedavna istraživanja pokazuju da određene nanočestice mogu doći u fetalnu cirkulaciju i akumulirati se u fetalnim organima. Za neke vrste nanočestica poput ugljičnih nanocjevčica postoje dokazi o potencijalnim teratogenim učincima, premda još uvijek nije jasno jesu li oni uzrokovani česticama (izravni učinci) ili uslijed oslobađanja majčinih ili posteljinih posrednika (neizravni učinci). Majčina izloženost nanomaterijalima postaje sve učestalija s povećanjem proizvodnje i korištenja takvih materijala u raznim proizvodima. S druge strane, modificirani nanomaterijal koristi se za razvoj novih načina liječenja. Nekoliko primjera pokazuje da se nanočestice mogu uspješno primijeniti kao nosači lijeka ili u molekularnoj dijagnostici.

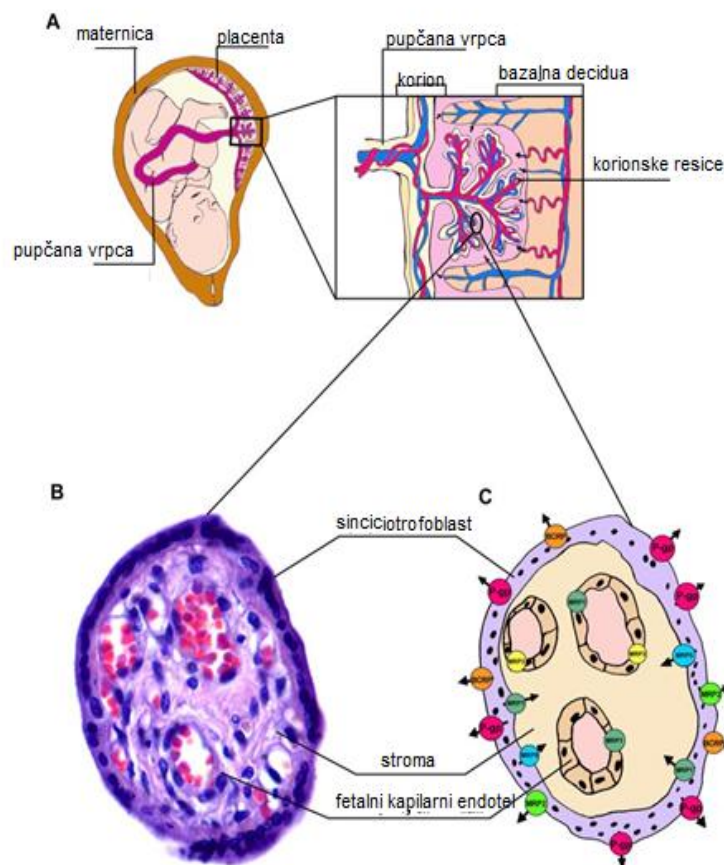
Specifični ciljevi rada su:

1. Procjeniti relevantne literaturne navode s ciljem zaključivanja o mogućnostima kontrole i upravljanja prijenosom nanočestica s ili bez uklopljene djelatne tvari u smislu farmaceutsko-tehnoloških i biofarmaceutskih značajki nanočestica.
2. Razumijevanje unosa nanočestica, njihovog nakupljanja i izlučivanja korištenjem predvidljivih modela prijenosa nanočestica preko barijere placente. Pregledno prikazati *in vitro* i *ex vivo* modele barijere placente s naglaskom na njihovu prikladnost za ispitivanje prijenosa nanočestica koje se koriste kao nosači djelatnih tvari.
3. Ispitati jesu li trenutno odobreni nanofarmaceutici na području Europske unije dopušteni za primjenu u trudnoći i tijekom dojenja.

3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

3.1. PLACENTARNI TRANSPORTNI MEHANIZMI

Placenta tvori selektivnu barijeru koja služi za prijenos hranjivih tvari koje su važne za fetus. Prijenos hranjivih tvari preko placente reguliraju mnogi različiti aktivni prijenosnici koji se nalaze na površini posteljičnih membrana, i onih s majčine strane i onih sa strane fetusa. Takvi su prijenosnici u placenti uključeni u procese olakšane difuzije hranjivih tvari (Knipp i sur., 1999). Smatra se također da je placenta prvi fetalni organ izložen egzogenim tvarima, uključujući i lijekove. Ljudska placenta je građena od tkiva fetusa (korionska ploča i korionske resice) i tkiva majke (bazalna ploča) (Slika 3. 1A). Decidualne pregrade koje nastaju iz bazalne ploče, dijele organ na 20-40 režnjeva (kotiledona) koji predstavljaju funkcionalne vaskularne jedinice placente. Svaki kotiledon sadrži resične ogranke koji se sastoje od fetalnog kapilarnog endotela, strome resica i sloja trofoblasta koji plivaju u majčinoj krvi u interviloznom prostoru (Slika 3. 1A i B). Vanjski sloj svakog viloznog stabla je građen od multinuklearnog sinciotrofoblasta (Slika 3. 1B) koji proizlazi iz spajanja mononuklearnih citotrofoblasta. Sloj sinciotrofoblasta je polariziran, sastoji se od mikrovilozne membrane u obliku četke (s majčine strane krvi) i bazalne membrane (krvotok s fetalne strane) i predstavlja barijeru za transplacentarni prijenos većine tvari. Kako trudnoća napreduje, tako se smanjuje debljina placentarne barijere, najvećim dijelom zbog djelomičnog nestanka sloja citotrofoblasta. S obzirom da je trofoblast u izravnoj vezi s majčinom krvi, kaže se da je ljudska placenta hemokorijalnog tipa. Uobičajene laboratorijske životinje, poput miševa, štakora, zamoraca ili kunića, također imaju hemokorijalnu placentu, za razliku od epi- ili endotelio korijalne placente kakve imaju neke druge životinjske vrste (ovca, svinja, pas, mačka). Međutim, postoje i druge razlike u građi placente koje mogu utjecati na svojstva placentarnog prijenosa i koje bi trebalo uzeti u obzir kod evaluacije transplacentarnog prijenosa u kojem se koriste životinjski uzorci (Ceckova-Novotna i sur., 2006).



Slika 3. Shematska struktura ljudske placente. (A) Presjek maternice u terminu trudnoće koji prikazuje fetus povezan s placentom preko pupčane vrpce. U detaljnoj je shemi prikazana struktura kotiledona, placentarne funkcionalne jedinice. Korion, fetalni dio placente, sastoji se od korionske ploče i korionskih resica koji plivaju u majčinoj krvi koja ulazi u intervilozni prostor kroz spiralne arterije u bazalnoj decidui. Kisik i hranjive tvari iz majčine krvi prelaze površinu sloja trofoblasta korionskih resica, ulaze u krvotok fetusa i prenose se do fetusa preko pupčane vene (crveno). Deoksigenirana krv teče iz fetusa kroz dvije pupčane arterije (plavo). (B) Parafinski presjeci terminalnih resica, obojeni hematoksilin-eozin metodom, kod ljudske placente u trećem tromjesečju (mikrofotografija). (C) Shematski prikaz terminalnih resica koji prikazuje lokalizaciju P-gp-a u apikalnoj mikroviloznoj membrani sinciciotrofoblasta i prisutnost drugih placentarnih efluks transportera lijekova (prilagođeno prema Ceckova-Novotna i sur., 2006).

Izloženost fetusa potencijalno štetnim lijekovima ovisi o sposobnosti prijenosa lijekova kroz placentu s majke na fetus. Količina lijeka koji će prijeći placentu ovisi o koncentraciji lijeka u majčinom krvotoku. Iako postoje i drugi važni čimbenici (tablica 7.), poput fizičkih i kemijskih značajki lijeka, veličina molekule djelatne tvari je snažan indikator uspješnog prijenosa preko placente. Lijekovi koji su manji od 500 Da nekada mogu prijeći, dok oni veći od 6000 Da, poput niskomolekularnog heparina rijetko kad prijeđu (Refuerzo i sur., 2011).

Postoji nekoliko mehanizama po kojima se događa prijenos, i ovisno o njima, smjer prijenosa može biti usmjeren prema majčinom ili fetalnom krvotoku. U ljudskoj placenti, sinciciotrofoblast nastaje spajanjem stanica citotrofoblasta, tvoreći sincicij preko površine placente sa strane majčine krvi. Plazma membrane sinciciotrofoblasta su polarizirane; četkasta membrana je u izravnoj vezi s majčinom krvi i bazalnom membranom sa strane krvotoka fetusa. Četkasta membrana posjeduje mikroviloznu strukturu koja učinkovito povećava površinu, dok bazalna membrana nema takvu strukturu (Malek i Mattison, 2010).

Tablica 7. Značajni čimbenici koji određuju prijenos lijeka preko barijere placente (Audus, 1999).

Značajke lijeka	<ul style="list-style-type: none"> • nizak stupanj ionizacije • lipofilnost • nisko vezanje na proteine • molekularna masa oko 600 Da ili manja.
Značajke placente	<ul style="list-style-type: none"> • krvotok (intervilozni majčin ili fetalni) – pod utjecajem patofizioloških uvjeta i lijekova • koncentracijski gradijent lijeka preko placente • hidrostatski gradijent – slabo kretanje prema fetalnom dijelu • pH gradijent – blago kiseli fetalni dio • stanjivanje i starenje barijere kako trudnoća napreduje • povećana površina kako trudnoća napreduje • razvojni metabolizam kojem se ne pridaje dovoljno pažnje • proteinski gradient – smanjena koncentracija albumina u majčinom dijelu s napredovanjem trudnoće, niža koncentracija α1-kiselog glikoproteina u fetalnom dijelu • prijenosnici hranjivih tvari (npr. nosači aminokiselina, glukoze, monoamina itd.) – osim pasivnom difuzijom, lijekovi se mogu prenijeti preko placente i nosačima hranjivih tvari.
Dodatni majčini i fetalni čimbenici	<ul style="list-style-type: none"> • rast i razvoj fetusa • metabolizam fetusa • vezanje na tkiva fetusa • metabolizam majke • zdravstveno stanje majke.

3.1.1. Jednostavna difuzija

Jednostavna difuzija je pasivni prijenos otopljenih tvari niz koncentracijski gradijent. Sve otopljene tvari se prenose difuzijom, ali mogu biti prenesene i drugim mehanizmima koji pojačavaju izmjenu između majčinog i fetalnog krvotoka. Kao primjer, respiratorni plinovi se izmjenjuju jednostavnom difuzijom. Mnogi često korišteni lijekovi prelaze placentu pasivnom ili jednostavnom difuzijom, uključujući: ampicilin, meticilin, cefmenoksin, cefotiam, trovafloksacin, lamivudin, pirimetamin, karbamazepin, antipirin, bupivakain, ganciklovir, aciklovir i oksitocin. Čimbenici koji određuju pasivnu difuziju preko placentе su fizičko-kemijske značajke molekule djelatne tvari, vezanje na proteine u majčinom i fetalnom krvotoku te metabolizam majke, fetusa ili placentе. Jedan čimbenik pasivne difuzije je molekularna masa molekule djelatne tvari – što je takva masa veća, to je prijenos manje vjerojatan. Hidrofobnost i ionizacija također utječu na placentarni prijenos i mogu utjecati i na količinu lijeka koja ostane odvojena ili vezana u tkivu placentе. Dok razlika u vezanju na proteine u majčinom i fetalnom krvotoku utječe na ukupnu razliku koncentracije između majčinog i fetalnog krvotoka, prijenos preko placentе predstavlja razliku slobodnih koncentracija lijeka. Zbog toga ukupne koncentracije mogu biti više u majčinom ili fetalnom krvotoku, ovisno o vezanju na albumin ili α -1-kiseli glikoprotein, ali slobodne koncentracije bi bile slične (Malek i Mattison, 2010).

3.1.2. Transcelularni prijenos

Takva vrsta prijenosa koristi transportne proteine. Unutar placentе se nalaze određeni proteini, vjerojatno razvijeni za endogene supstrate koji prenose tvari visoke učinkovitosti s majčinog u fetalni krvotok (inluksni transporteri) ili s fetalnog u majčin krvotok (efluksni transporteri). Transportni proteini mogu biti izraženi u mikroviloznim četkastim ili bazalnim membranama sinciciotrofoblasta, odnosno u endotelu kapilara fetusa smještenih u resicama. Mnogi od tih transportera mogu se pronaći u drugim organima, npr. crijevu, jetri, mozgu i bubrezima, gdje se ponašaju slično. U razvoju lijekova, takvi transportni proteini omogućuju ciljano djelovanje određenog lijeka ili onemogućuju pristup lijeka tkivu placentе ili fetusa. Primjeri efluksnih transportera u placenti uključuju ABC transportere (engl. ATP binding cassette), kao što su proteini otpornosti na antitumorske lijekove koji se

primjenjuju za liječenje raka dojke (BCRP) i proteine višestruke otpornosti na lijekove (MDRP). Primjeri influksnih transportera uključuju transportere organskih kationa, transportere dikarboksilata i transportere Na^+ /multivitamina. Ekspresija P-glikoproteina (P-gp) na majčinu stranu placente (npr. na četkasti dio sinciciotrofoblasta sa strane interviloznog prostora) je kodirana unutar sinciciotrofoblasta gena višestruke otpornosti na lijekove (ABCB1). U nekim stanicama P-gp ima fiziološke supstrate (npr. estradiol-glukuronid, progesteron i opioidnini uropeptidi), ali i prenosi lijekove (npr. digoksin i verapamil) iz placente od krvotoka fetusa. Funkcija takvog proteina je posredovanje aktivnim efluksom supstrata iz stanica, a korištenjem energije od ATP hidrolize. Aktivni transport posredovan P-gp-om je jednosmjernan te olakšava efluks supstrata zbog nesimetrične membranske topologije proteina. Čini se da su se takvi efluks transporteri razvili kao zaštitni mehanizmi i da su eksprimirani, pored posteljice, u probavnom sustavu, bubrezima, jetri i krvno-moždanoj barijeri (Malek i Mattison, 2010). Tablicom 8. pregledno su prikazane vrste trancelularnog prijenosa djelatne tvari.

Tablica 8. Vrste transcelularnog prijenosa djelatne tvari (prilagođeno prema Malek i Mattison, 2010).

Vrsta prijenosa djelatne tvari	Opis prijenosa
Kanali	Proteini tvore pore ispunjene vodom u staničnoj membrani kroz koju ioni mogu difundirati niz elektrokemijski gradijent. Omogućen je transport nabijenih hidrofilnih tvari. Akvaporini iz placente i kloridni kanali su primjeri kanala koji sudjeluju u prijenosu vode i malih molekula, a ključni su za razvoj fetusa.
Olakšana difuzija	Prijenosnici su proteinski nosači ograničenog kapaciteta koji su neovisni o metaboličkoj energiji, tako da se transport može odvijati brže nego što bi to bilo u jednostavnoj difuziji, ali neće se odvijati nasuprot koncentracijskom gradijentu ili drugom gradijentu koji služi kao pokretač. Kao primjer, glukoza se prenosi facilitiranim glukoznim transporterima. Također se smatra da se metformin prenosi iz krvotoka fetusa u krvotok majke olakšanom difuzijom.
Aktivni transport posredovan nosačima	Primarni aktivni transport koristi izvor energije poput ATP-a za prijenos topljivih tvari nasuprot koncentracijskom gradijentu, natrij kalij (Na^+K^+) ATPaza i kalcij (Ca^{2+}) ATPaza su dva primjera. Sekundarni aktivni transport koristi koncentracijske gradijente po stanicama koje je postavio primarni sustav; Na^+ amino kiselina kotransport i $\text{Ca}^{2+}\text{Na}^+$ izmjenjivači su primjer. Poznato je da su transportne ATPaze prisutne u ljudskoj placenti. One uključuju Na^+K^+ crpku (Na^+K^+ ATPaza), koja je smještena na mikrovilu i bazalnoj membrani, i Ca^{2+} ATPazu visokog afiniteta smještenoj na bazalnoj membrani. Smatra se da su takvi aktivni transportni proteini deregulirani u abnormalnostima rasta fetusa.

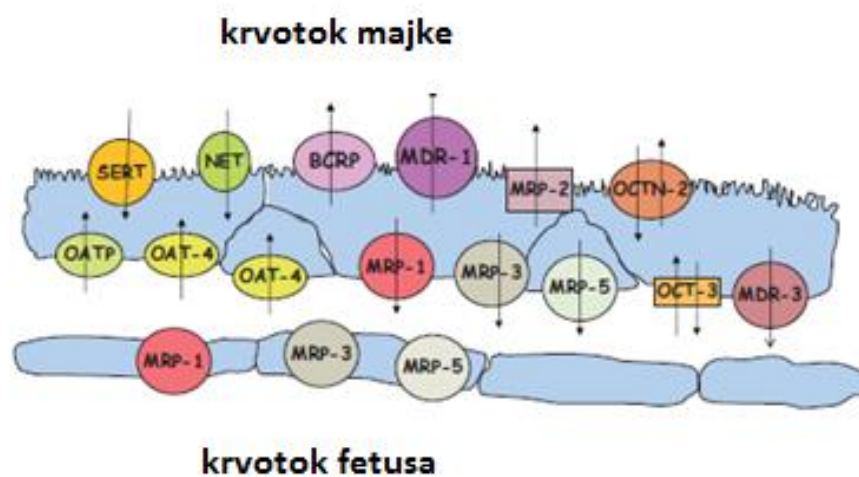
3.1.3. Endocitoza i egzocitoza

Pri endocitozi se invaginira stanična površina u svrhu stvaranja vezikula ispunjenih sadržajem. Egzocitoza je suprotan proces; vezikule se spajaju sa staničnom membranom kako bi ispustile svoj sadržaj. Takav proces mogu posredovati receptori, tj. pokreće ga posebna interakcija između topljive tvari i receptora na staničnoj membrani. Većina lijekova prolazi ljudsku placentu pasivnom difuzijom; međutim, bilo koji od prethodno opisanih mehanizama također može biti uključen. Nosači plazma membrane, biotransformacijski enzimi, i efluksne i inluksne crpke (transportni proteini) mogu imati ulogu u prijenosu s majke na fetus. Čimbenici koji utječu na prijenos su molekularna težina, stupanj ionizacije, topljivost, vezanje na proteine i tijek krvi fetusa i unutar majčine placentе, te pH. Liposolubilni, neionizirani lijekovi koji nisu vezani za proteine, težine manje od 600 Da slobodno prolaze kroz placentu. Lijekovi velike molekularne težine, poput inzulina (6000 Da) ne izmjenjuju se između krvotoka majke i fetusa u značajnoj količini. Jedna od važnih funkcija placentе je prijenos antitijela (IgG) s majke na fetus, koji se može dogoditi ako je majka cijepljena tijekom trudnoće. Takvo pasivno cijepljenje fetusa zahtijeva ekspresiju placentalnog FcRn receptora (Malek i Mattison, 2010).

3.1.4. Transporteri lijekova u ljudskoj krvno-placentalnoj barijeri

U placenti, sinciciotrofoblast i fetalni kapilarni endotel sadrže transportere (slika 4). Izloženost fetusa je određena konačnim rezultatom kombinacije transportera, njihovom prirodom i lokalizacijom u odnosu na stanice placentе i specifičnosti njihovih supstrata. Transportere u svim grupama koje sudjeluju u transportu lijekova možemo pronaći u ljudskoj placenti. Osobito ABC transportere (primjerice, ABCG2/proteini otpornosti na lijekove povezani s rakom dojke, ABCB1/P-glikoprotein i ABCC2/MRP2 koji su eksprimirani na apikalnoj površini sinciciotrofoblasta prema majčinoj krvi i mogu biti važni zaštitni proteini i za tkivo placentе i za fetus jer su oni efluksni transporteri i njihovi supstrati uključuju mnoge lijekove i druge ksenobiotike iz okoline. Efluksni transporteri lijekova poput P-glikoproteina (P-gp), nekoliko proteina povezanih s višestrukom otpornošću na lijekove

(MRP) i proteini otpornosti na lijekove povezan s rakom dojke (BCRP) mogu pružiti mehanizme koji štite fetus. Transporteri žučne kiseline također mogu igrati ulogu u iznošenju tvari u majčin dio. Steroidni hormoni izravno utječu na stupanj ekspresije i funkciju kod nekih od navedenih transportera. Istraživanje veze između hormona trudnoće i navedenih efluksnih transportera lijekova jedan je od mogućih ključeva u razvoju strategije za davanje lijekova majci s minimalnim rizikom za fetus (Vahakangas i Myllynen, 2009; Young i sur., 2003).



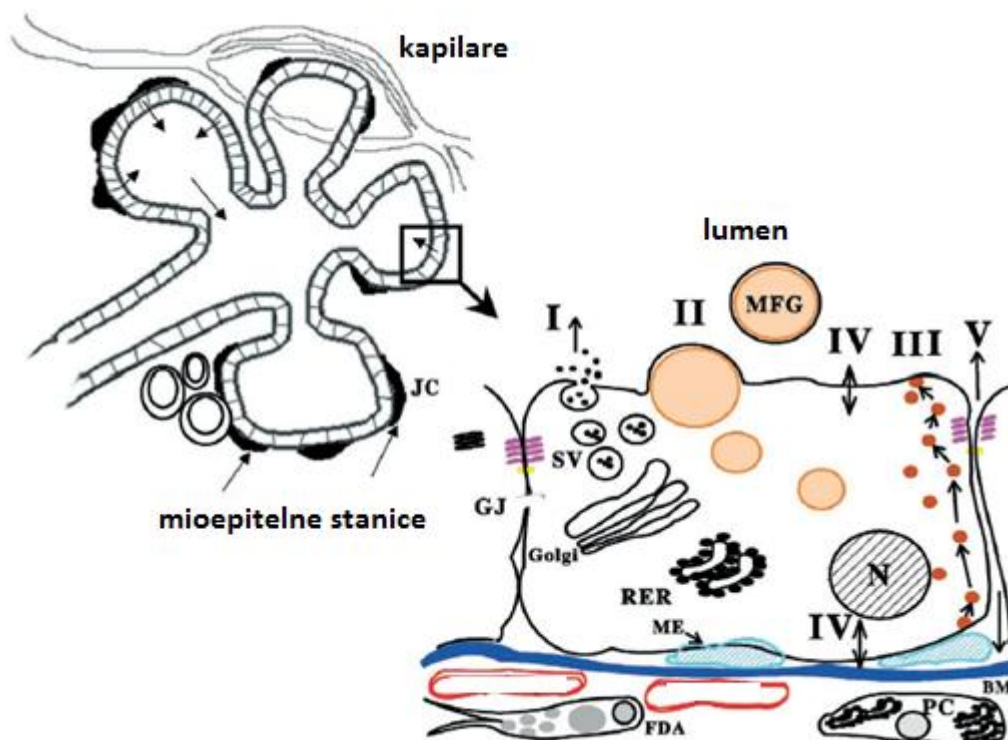
Slika 4. Ljudska placentarna barijera u terminu. Glavni transportni proteini izraženi u ljudskoj placentarnoj barijeri i njihova lokalizacija. BCRP, protein otpornosti na lijekove povezan s rakom dojke; MDR, protein višestruke otpornosti na lijekove; MRP, protein povezan s višestrukom otpornošću na lijekove; NET, transporter nordrenalina; OAT, transporter organskih aniona; OATP, polipeptid koji transportira organske anione; OCTN, transporter organskih kationa; SER, transporter serotonina (prilagođeno prema Vahakangas i Myllynen, 2009).

Ispitivanja na životinjama snažno zagovaraju važnost placentarnih prijenosnika lijekova kad je riječ o funkciji placente i sigurnom razvoju fetusa. Međutim, struktura ljudske placente je složena i postoje značajne razlike u strukturi i funkciji placente kod različitih vrsta, što otežava humanu ekstrapolaciju rezultata ispitivanja na animalnim modelima. Rezultati ispitivanja na različitim *in vitro* modelima djelomično su proturječni, što otvara pitanje kako najbolje proučavati prijenos do fetusa. Eksperimentalni modeli koji koriste tkivo ljudske placente, osobito perfuzijski modeli ljudske

placente, pružaju različite mogućnosti koje su do sad neadekvatno procijenjene. Klinička uporaba prijenosnika i njihovih inhibitora u farmakoterapiji zahtijeva detaljnija ispitivanja. Jednako su važne mehanističke studije, koje bi trebale razviti ideje i mogućnosti kako upotrijebiti znanja iz područja razvoja lijekova i zaštite fetusa (Vahakangas i Myllynen, 2009; Young i sur., 2003).

3.2. ČIMBENICI KOJI KONTROLIRAJU PRIJENOS LIJEKOVA U MLIJEKO

3.2.1. Fiziologija dojke



Slika 5. Shematski prikaz alveola dojke i alveolarnih epitelnih stanica prikazuje kanaliće za izlučivanje mlijeka. Mlijeko se izlučuje kroz alveolarne epitelne stanice u lumen (strelice). Tada se potiskuje kroz kanaliće kontrakcijom epitelnih stanica koje okružuju alveolarne i epitelne stanice kanalića. Alveola je okružena dobro razvijenim krvožilnim sustavom i stromom koja gradi komponente izvanstaničnog matriksa, fibroblaste i adipocite. Dio prikazan kvadratom je povećan kako bi prikazao ključne strukturne i transportne značajke alveolarnih stanica. Kanalić I prikazuje egzocitotičko izlučivanje mliječnih proteina, laktoze, kalcija i drugih komponenti u vodenoj fazi mlijeka. Kanalić II prikazuje izlučivanje mliječne masti s formiranjem kapljica lipida okruženih citoplazmom (CLD) koje se kreću do apikalne membrane kako bi bili izlučeni kao globule mliječne masti vezane za membranu (MFG). Kanalić III prikazuje vezikularnu transcitozu proteina poput imunoglobulina iz međuprostornog područja. Kanalić IV prikazuje transportere za izravno kretanje monovalentnih iona, vode i glukoze preko apikalnih i bazalnih membrana stanice. Kanalić V prikazuje transport kroz paracelularni put za komponente plazme i leukocite. Kanalić V je otvoren samo tijekom trudnoće, involucije i upalnih stanja poput mastitisa. Skraćenice: SV, vezikule za izlučivanje; RER, hrapavi endoplazmatski retikulum;

BM, bazalna membrana; N, jezgra; PC, plazma stanice; FDA, adipociti bez masnoća; JC, kompleks koji sadrži čvrste i adherentne spojeve; GJ, propusna veza; ME, mioepitelna stanica (prilagođeno prema McManaman i Neville, 2003).

Pet općenitih kanalića je opisano za transport proteina, lipida, iona, hranjivih tvari i vode u mlijeko. Četiri od njih su transcelularni, uključuju transport kroz najmanje dvije membranske barijere; peti je paracelularni i omogućuje izravnu razmjenu međuprostornih i mliječnih komponenti. Transport topljivih tvari takvim kanalima se odvija posredovanjem različitog i kompleksnog niza transportnih procesa i procesa izlučivanja koje reguliraju hormonski, razvojni i fiziološki čimbenici (McManaman i Neville, 2003).

3.2.2. Puferski sustavi

Mlijeko sadrži citratne i fosfatne pufere, iako s prilično ograničenim puferskim kapacitetom. pH mlijeka je malo niži nego plazme (6,8-7,3). Stoga, lijekovi koji su slabe baze postaju više ionizirani smanjenjem pH vrijednosti i znaju imati višu koncentraciju u mlijeku. Razlike u pH vrijednosti mlijeka i plazme imaju znatan utjecaj na M/P omjer. Smatralo se da se samo nevezani, neionizirani oblici molekula mogu razdijeliti iz plazme u mlijeko. Koristeći prilagođenu Henderson-Hasselbalchovu jednadžbu, može se izračunati M_u/P_u omjer (gdje u predstavlja nevezani lijek) (Fleishaker, 2003):

Za kisele lijekove	Za bazne lijekove
$M_u/P_u = \frac{1 + 10^{(pH_M - pK_a)}}{1 + 10^{(pH_P - pK_a)}}$	$M_u/P_u = \frac{1 + 10^{(pK_a - pH_M)}}{1 + 10^{(pK_a - pH_P)}}$

Takva jednadžba precizno predviđa eksperimentalni omjer nevezanog lijeka u mlijeku prema nevezanom lijeku u plazmi, ali ne predviđa M/P omjer za većinu lijekova. Omjer M/P je klinički više važan jer se njegova vrijednost može koristiti kako bi se odredila doza lijeka koju dijete prima dojenjem. Opet se smatra da samo neionizirani, nevezani oblik molekule može proći membrane u alveolama dojke. Međutim, nevezani lijek se može vezati za proteine u mlijeku i plazmi. Nadalje, lijek se može razdijeliti na masne globule u mlijeku (Fleishaker, 2003). Matematički, omjer M/P izražen je kao:

$$M/P = \frac{f_P \times f_P^{un}}{f_M \times f_m^{un} \times S/M}$$

Gdje su f_M i f_P nevezani dijelovi u mlijeku i plazmi, f_M^{un} i f_P^{un} su neionizirani dijelovi u mlijeku i plazmi, a S/M je omjer koncentracije masti u punomasnom mlijeku.

Oba modela pretpostavljaju da je pasivna difuzija jedini proces koji kontrolira prijenos lijeka između mlijeka i plazme. Takva će pretpostavka vrijediti za mnoge lijekove. Međutim, potvrđen je aktivni transport u ljudsko mlijeko za određene lijekove (Fleishaker, 2003).

3.2.3. Proteini

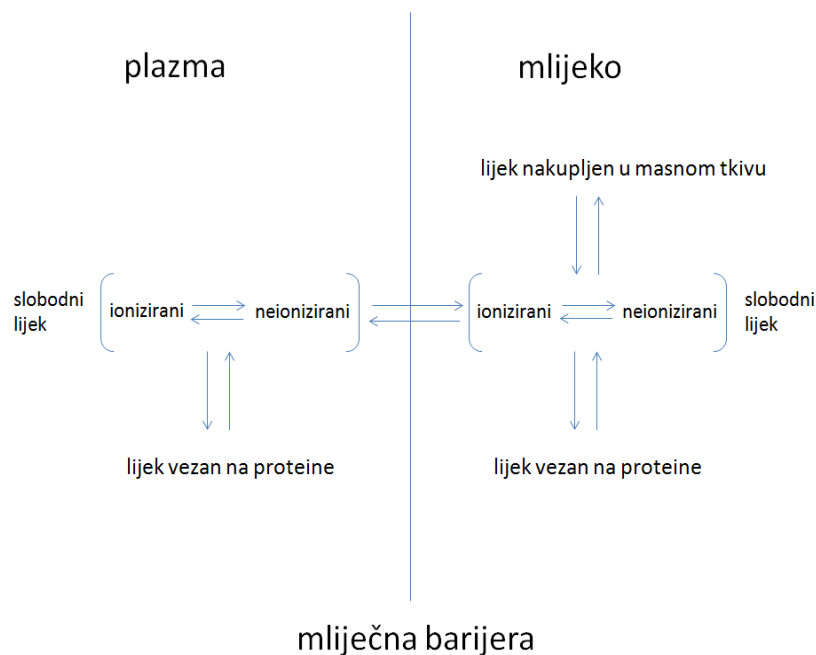
Ukupna koncentracija proteina u ljudskom mlijeku je oko 0,9 g/dl. Proteini u ljudskom mlijeku se nalaze u kazeinu i sirutki. Kazein, koji se taloži pri niskim pH vrijednostima, čini 20-30% proteina ljudskog mlijeka. Kazeini su heterogena skupina proteina, s molekularnom težinom od 20000 do 30000 Da. Otkriveno je da je kazein bio primarno odgovoran za vezanje nekoliko benzodiazepina u ljudskom mlijeku. Sirutka sadrži veliki broj proteina, koji se dobiju i od mlijeka i od plazme. Tri proteina koja će sigurno biti uključena u vezanje lijekova su α -laktalbumin, laktoferin i laktalbumin. Međutim, α -laktalbumin nije uopće vezao djelatne tvari; primjerice, diklofenak, fenitoin, varfarin, atenolol, flunitrazepam, ketotifen, propranolol, digoksin i prednizolon. Laktoferinin i albumin su bili glavni proteini sirutke povezani s vezanjem lijekova (Fleishaker, 2003).

3.2.4. Lipidi

Ljudsko mlijeko sadrži oko 2,1-3,1% masnoće. Glavni sastojci lipida (98%) ljudskog mlijeka su trigliceridi. Masne kiseline esterificirane u takvom obliku uglavnom su duljine 16-18 ugljikovih atoma. Ostatak lipidne faze sastoji se od slobodnih masnih kiselina, mono- i diglicerida, fosfolipida, enzima, proteina i glikoproteina. Masne globule u ljudskom mlijeku su promjera 2-3 μ m (Fleishaker, 2003).

3.2.5. Razlike u sastavu mlijeka

Sastav mlijeka nije stalan, nego na njega utječe vrijeme pojedinačnog hranjenja i trajanje dojenja nakon poroda. Unutar pojedinačnog hranjenja, mlijeko koje se izlučuje na početku podoja (prvo mlijeko) je manje masno. Masnoća se povećava tijekom hranjenja, s neproporcionalno visokom koncentracijom masnoće na kraju podoja (zadnje mlijeko). Razina proteina ostaje relativno konstantna tijekom podoja, ali povećava se pH vrijednost mlijeka kako hranjenje traje. Kolostrum je ljepljiva žuta tekućina koja se nalazi u mliječnim žlijezdama od sredine trudnoće nadalje. Izlučuje se od razdoblja ubrzo nakon poroda pa do oko 5 dana nakon poroda. Kolostrum sadrži puno proteina, a malu razinu laktoze i masti. Povećana razina proteina je uglavnom rezultat visoke razine imunoglobulina i laktoferina. Od petog do petnaestog dana nakon poroda, razina masnoće se udvostruči, dok se koncentracija proteina smanji za četiri, kako bi dosegla razinu zrelog mlijeka. U sljedećem periodu, mala je razlika u sastavu mlijeka iz dana u dan. Razlike u sastavu mlijeka mogu utjecati na koncentraciju lijekova u mlijeku, i trebale bi se uzeti u obzir kod planiranja studija koje procjenjuju prijenos lijekova u mlijeko i rizik za dijete. Omjer M/P kao ključni parametar kod procjenjivanja izlaganja dojenčeta lijekovima kroz majčino mlijeko nije određen *in vivo* kod ljudi za većinu lijekova. Postoje razne metode za predviđanje omjera M/P, koje uključuju *in vitro* pokuse u jednoslojevima stanica dojke, procjenu vezanja lijekova na proteine plazme i mlijeka i lipida, *in vivo* pokusi na životinjama i regresijski modeli koji se temelje na fizičko-kemijskim značajkama molekula djelatne tvari.



Slika 6. Shematski prikaz distribucije lijekova između plazme i mlijeka; mehanizmi izlučivanja lijekova u majčinom mlijeku uključuju pasivnu difuziju i prijenos posredovan nosačima (prilagođeno prema Fleishaker, 2003).

Ako je poznata točna koncentracija lijeka u majčinom mlijeku kroz određeni vremenski period, može se procijeniti doza koju će dojenče primiti po jedinici vremena uzimajući u obzir određenu količinu mlijeka (npr. 150 ml po kilogramu tjelesne mase po danu). Takva se procijenjena doza zatim uspoređuje s terapijskom dozom lijeka i izražava indeksom izloženosti, koji je proporcionalan omjeru mlijeka naspram plazme i obrnuto proporcionalan klirensu lijeka u dojenčeta. Indeks izloženosti značajan je za količinu lijeka u majčinom mlijeku koje dojenče popije i izraženo je kao postotak terapijske (ili ekvivalentne) doze za dojenče. S obzirom da su M/P omjer i klirens lijeka određeni hiperboličkom funkcijom koja definira razinu izloženosti dojenčeta, onda će lijekovi s niskim klirensom vjerojatno rezultirati većom razinom izloženosti i velikim varijacijama u takvim razinama, ovisno o M/P omjeru. S druge strane, ako je klirens lijeka dovoljno visok, niti visoki M/P omjer neće rezultirati značajnom izloženošću, dok će promjene u klirensu lijeka i M/P omjeru imati manji utjecaj na razinu izloženosti. Očito je klirens lijeka u dojenčeta važniji za određivanje razine izloženosti lijeku u odnosu na M/P omjer. Za većinu lijekova nije poznata granična doza ispod koje nema nikakvog kliničkog učinka za dojenče. Ako je doza primljena kroz majčino mlijeko manja od 10% od terapijske

doze, ili ako je indeks izloženosti manji od 10%, razina izloženosti dojenčeta lijeku kroz majčino mlijeko ne smatra se klinički značajnom. Međutim, postoje iznimke opisanom pristupu; primjerice, u dojenčadi s manjkom enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze može se javiti hemoliza uzrokovana lijekovima pri vrlo niskim koncentracijama pojedinih lijekova u plazmi (Ito, 2000).

3.3. DIZAJN I RAZVOJ LIJEKOVA U TRUDNOĆI

Razvoj lijekova za primjenu u trudnoći istodobno je jedna od najizazovnijih i najzahvalnijih prilika u razvojnoj biologiji i kliničkoj medicini, s mogućnošću utjecaja na milijune života podjednako u razvijenim i zemljama u razvoju. Izazov je suvremene terapije lijekovima u trudnoći razvoj novih pristupa za postizanje sigurne primjene i selektivnog učinka lijekova u trudnoći. Ključno je ograničiti nepotrebnu izloženost lijeku majku i fetus (Audus, 1999).

Razvoj suvremenih oblika lijekova trebao bi se osnivati na razumijevanju bolesti majke, placente ili fetusa koju je potrebno liječiti, prepoznajući istodobno sva druga područja (nus)djelovanja lijeka daleko od terapijskih ciljeva. U svakom slučaju bitno je postizanje optimalne koncentracije lijeka na ciljanom mjestu djelovanja, a s minimalnom koncentracijom lijeka u tkivu i organima koji su izvan oboljelog područja. Pri razvoju novih lijekova i/ili farmaceutskih oblika lijekova za primjenu u trudnoći potrebno je uvažavati sljedeće:

- (i) Koje su skupine molekula djelatne tvari dostupne i potencijalno učinkovite za liječenje oboljenja majke, placente ili fetusa? Jesu li razvijeni pretklinički modeli bolesti za procjenu molekula djelatne tvari?;
- (ii) Unutar skupina molekula djelatne tvari, jesu li neke od njih bolje iz razloga vezanih za farmakokinetiku, farmakodinamiku, sigurnost ili učinkovitost? Primjerice, ako je područje interesa liječenje fetusa, primjena molekula djelatne tvari koje su supstrati efluksnih transportera placente može rezultirati postizanjem toksične koncentracije lijeka za majku. U tom slučaju moguće je koristiti dodatni lijek koja inhibira efluksne transportere placente, smanjujući tako štetan učinak osnovnog lijeka za majku, a pritom zadržavajući terapijsku koncentraciju lijeka za fetus;
- (iii) U dizajnu kliničkih ispitivanja bitno je dobro procijeniti rezultate određivanja terapijske doze. Iz kojih uzoraka (primjerice, majčin urin, krv, izdah ili amnionska tekućina) su određene terapijske

koncentracije lijeka? Mijenjaju li se farmakokinetika i farmakodinamika tijekom trudnoće i kako takve promjene utječu na režim doziranja i procjenu ishoda liječenja?;

(iv) Kako klinička ispitivanja procjenjuju štetne učinke lijekova i kroz koji vremenski period će takvi štetni učinci biti praćeni? U kojem periodu se prati izloženost ploda (Sachs i Drugs, 2013)?

3.4. FUNKCIJA PLACENTE I RAZVOJ LIJEKOVA

Placenta osigurava izravnu vezu majke i fetusa, prenoseći hranjive tvari za rast i razvoj fetusa, kao i za vlastiti rast i razvoj. Štetni produkti metabolizma fetusa ili placente eliminiraju se prijenosom u majčin krvotok. Jedinstvena funkcija placente je njena endokrina uloga, a što je potrebno uzeti u obzir kod razvoja lijekova koji se koriste u trudnoći. Primjerice, lijekovi namijenjeni liječenju trudnica bi se trebali u što je moguće manjoj mjeri prenositi u krvotok fetusa i imati minimalan utjecaj na zdravlje placente i fetusa. Lijekovi za liječenje bolesti placente bi trebali biti koncentrirani unutar placente s minimalnim učincima na majku i fetus. Nadalje, lijekovi za liječenje bolesti fetusa bi trebali imati nesmetan pristup krvotoku fetusa, a s minimalnim učinkom na majku ili placentu. Krvotoke majke i fetusa razdvaja posteljično tkivo koje se mijenja tijekom trudnoće, anatomske se povećava površina preko koje se događa izmjena tvari između majke i fetusa, a smanjuje se udaljenost cirkulacije majke i fetusa. Morfološki se stanjuje sloj sinciotrofoblasta, dok citotrofoblast postaje diskontinuiran. Promjene u strukturi resica obuhvaćaju povećanje broja mikrovila koje olakšavaju izmjenu tvari majke i fetusa. Anatomske razlike među vrstama u broju slojeva trofoblasta i veze između tkiva majke i fetusa rezultiraju različitim funkcijama placente, a što utječe na podatke prikupljene tijekom pretkliničke faze razvoja lijekova. Čimbenici poput difuzije, električnog potencijala placente, brzine majčinog i fetalnog protoka krvi, razlike u metabolizmu, transportnim proteinima i drugim mehanizmima za izmjenu tvari između krvotoka majke i fetusa, trebali bi se uzeti u obzir jer se prijenos i metabolizam lijekova razlikuju od vrste do vrste (Malek i Mattison, 2010).

3.5. MODELI PLACENTARNOG PRIJENOSA - MOGU LI SE PRIMJENITI NA STUDIJE PRIJENOSA NANOČESTICA?

U procesu razvoja lijekova korišteni su brojni stanični i/ili tkivni modeli s ciljem ispitivanja prijenosa lijeka. Podaci o permeabilnosti lijeka korištenjem različitih eksperimentalnih barijernih modela mogu se razlikovati među laboratorijima u kojima su provedena ispitivanja, iako su u konačnici dobivene dobre *in vitro-in vivo* korelacije. Među važnim čimbenicima koji utječu na rezultate permeabilnosti su laboratorijski materijali (primjerice, mediji za uzgoj staničnih linija), izvor bioloških materijala (primjerice, stanične linije) i relativno nestandardizirani laboratorijski protokoli ispitivanja. S ciljem postizanja što objektivnijih i usporedivih rezultata ispitivanja permeabilnosti potrebno je sljedeće: razviti i implementirati standardizirane protokole ispitivanja, laboratorijski uvjeti ispitivanja permeabilnosti trebaju u što je moguće većoj mjeri oponašati realnu *in vivo* situaciju s ciljem postizanja dobre *in vitro-in vivo* korelacije. Iako se *in vivo* ispitivanja permeabilnosti na animalnim modelima bolje slažu s rezultatima kod ljudi, stanični i tkivni modeli imaju nekoliko prednosti: (1) potrebna je manja količina lijeka za ispitivanje; (2) udovoljeno je etičkim zahtjevima vezano za korištenje eksperimentalnih životinja; (3) osiguran je primjeren kapacitet ispitivanja u smislu broja ispitanih uzoraka u jedinici vremena; (4) mogu se detaljno ispitati mehanizmi transporta i metabolizma lijeka; (5) vezana analitička ispitivanja su jednostavnija u usporedbi s analizom složenih bioloških tekućina (Volpe, 2008). Iako je razvijeno nekoliko placentarnih modela, samo ih je nekoliko prikladno za ispitivanja translokacije nanočestica, a uključuju ispitivanja *in vivo* na animalnom modelu glodavaca, *ex vivo* perfuzijska ispitivanja na modelu ljudske placente u terminu, ispitivanja *in vitro* prijenosa preko trofoblastnog monosloja stanica uzgojenih na mikroporoznoj membrani (Muoth i sur., 2016).

3.5.1. *In vitro* modeli placente

Stanice citotrofoblasta moguće je izolirati iz ljudske placente i uzgojiti tvoreći sincicij koji se može koristiti za istraživanje apsorpcije lijeka, metabolizma, efluksa ili prijenosa preko sincicija. Međutim, takvo ispitivanje je složeno zbog zahtjevnosti pripremanja čistih dijelova citotrofoblasta. Nadalje, trenutno kulture citotrofoblasta ne mogu opstati dulje od jednog tjedna. Drugi slični pristupi uključuju razvoj imortaliziranih staničnih linija citotrofoblasta ljudske placente (Malek i Mattison, 2010). Za

ispitivanja permeabilnosti preko jednog ili više slojeva stanica, uzgojene su stanice placente na mikroporoznim membranama koje su obložene kolagenom ili na amnionskim membranama. Razvoj takvih *in vitro* modela osigurava proučavanje prijenosa malih molekula (primjerice, glukoze ili malih molekula lijekova) ili nanočestica. U najvećem broj *in vitro* ispitivanja permeabilnosti korištena je BeWo b30 stanična linija trofoblasta ljudske placente, kojom je moguće postići zadovoljavajuće barijerne značajke u svrhu ispitivanja prijenosa lijeka s majke na fetus. Takav *in vitro* model dobro korelira s *ex vivo* perfuzijskim modelom placente za male molekule. Još nije utvrđeno je li takav *in vitro* model primjeren za ispitivanje prijenosa nanočestica. S tim u vezi *in vitro* modeli su ograničene sposobnost ekspresije različitih prijenosnika, odnosno stvaranja funkcionalnog sincicija. Kako bi se prevladala takva ograničenja modela, stanične linije bi trebalo zamijeniti humanim trofoblastima iz resica placente u terminu. Nadalje, iskustva drugih modelnih barijera pokazuju da kokulture različitih tipova stanica poboljšavaju predvidljivost modela u smislu prijenosa nanočestica. Moguće je da bi uključivanje dodatnih tipova stanica (primjerice, fetalne endotelne stanice, fibroblasti iz resica ili Hofbauerovi makrofagi) unaprijedilo *in vitro* modele placente. Za ispitivanja prijenosa nanočestica kroz različite kanale, razvoj 3D modela placente mogao bi biti zanimljiv pristup. Još jedna strategija za povećanje predvidljivosti *in vitro* modela prijenosa je postizanje dinamičkih biorelevantnih uvjeta. Naime, pokazano je da trofoblasti reagiraju na pritisak tekućine stvaranjem mikrovilozne tvorbe, promjenama u influksu Ca^{2+} , lokalizacijom GLUT1 membranskih transportera, kao i promijenjenim unosom i transportom glukoze. Nadalje, javlja se potreba za poboljšanim membranama koje neće pružati otpor prijenosu nanočestica ili aglomerata nanočestica. Parametri za potencijalnu modifikaciju su veličina pora, distribucija i gustoća pora te debljina i sastav membrana. Veličina pora membrane bi trebala biti dovoljno velika kako bi se omogućio brzi prolaz nanočestica ili malih aglomerata, ali i dovoljno mala kako bi se spriječila neželjena migracija stanica kroz pore. Očekuje se da bi i homogena raspodjela pora i velika gustoća pora također poboljšala prijenos nanočestica kroz mikroporozne membrane. Smanjivanje debljine membrane bi moglo poboljšati prolaz nanočestica, zbog znatno niskog vremena difuzije i smanjenog prijanjanja nanočestica za stijenke kanala, što zauzvrat može dovesti do začepljenja pora membrana, odnosno što sprečava daljnji transport nanočestica. Međutim, debljina membrana je izravno povezana s mehaničkim značajkama membrane. S obzirom da

membrana mora služiti kao potpora za rast stanica i oblikovanje stanične barijere, membrane za *in vitro* ispitivanja moraju biti određene stabilnosti pod teretom stanica i tekućina, kao i tijekom izvođenja pokusa. Prvi pokušaj kojim bi se postiglo poboljšanje membrane je razvoj 500 nm debelih membrana od silicijevog nitrida s raspodjelom pora koji bi omogućio lagan i brzi prijenos nanočestica. Posljednji izazov će biti pronaći materijal s optimalnim površinskim značajkama koje bi podržale spajanje i rast stanica, istodobno sprečavajući prijanjanje nanomaterijala (Muoth i sur., 2016).

3.5.2. *Ex vivo* modeli placente

Iako je tkivo placente dostupno odmah nakon poroda, tkivo je izloženo stresu porođaja i ishemijskom periodu od 20-30 minuta prije provođenja ispitivanja ili izradi staničnih frakcija. Unatoč takvim stresnim uvjetima, tkivo placente pokazuje izvanredni otpor ishemijskoj hipoksiji uslijed mehanizama prilagodbe koji omogućuju tkivu preživljavanje i održavanje funkcije. Korišteni su mnogi modeli, poput staničnih kultura, eksplantacije tkiva i *ex vivo* perfuzije tkiva placente, kako bi se istražio širok spektar funkcija poput stanične proliferacije i diferencijacije, proizvodnje hormona i endokrine funkcije; permeabilnosti, transporta, influksa, efluksa i metabolizma lijekova (Malek i Mattison, 2010).

Eksplantati ljudske placente pružaju dodatne mogućnosti za istraživanje placentarnog transporta, metabolizma, enzimske i endokrine funkcije te stanične proliferacije i diferencijacije. Eksplantati ljudske placente imaju životni vijek od oko 2 tjedna, ali bi ispitivači trebali pažljivo procijeniti integritet eksplantata. Kultura eksplantata resica pruža model u kojem je djelomično održana struktura tkiva. Nadalje, takav model omogućuje pokuse u kojima se koriste placentarna tkiva iz različitih stadija trudnoće (Malek i Mattison, 2010).

Izolirane membranske vezikule iz placentarnog trofoblasta mogu se zasebno pripremiti i iz plazma membrane fetusa i plazma membrane majke. Vezikule trofoblasta se mogu koristiti za proučavanje mehanizama transporta preko četkastog pokrova ili bazalnih membrana sinciciotrofoblasta. Prednosti takvog pristupa su da vezikule mogu biti pripremljene iz placente u različitoj gestacijskoj dobi i patološkim stanjima poput preeklampsije ili intrauterine restrikcije rasta (Malek i Mattison, 2010).

Ex vivo perfuzijski model placente omogućuje ispitivanje placentarnog prijenosa, metabolizma, influksa ili efluksa, kao i kinetički profil i djelovanje različitih tvari na tkivo placente. Takav je model korišten za proučavanje prijenosa mnogih tvari, poput hranjivih tvari, hormona proteina, lijekova i štetnih droga te nudi izrazito korisno oruđe za razvoj lijekova (Malek i Mattison, 2010). Od 2008. godine *ex vivo* perfuzijska ispitivanja provedena su s nanočesticama, dajući tako važne podatke o prijenosu nanočestica s visokom razinom *in vivo* značajnosti. Jako važno u budućnosti razumjeti predvidljivu vrijednost *ex vivo* perfuzijskih modela za ispitivanja prijenosa nanočestica jer nije moguće pretpostaviti da će se nanočestice ponašati kao mali molekularni spojevi. Unos i biodistribucija nanočestica može se razlikovati u usporedbi s malim molekulama jer mehanizmi unosa nanočestica nisu još dovoljno poznati i ovise o značajkama nanočestica. Primjerice, površina nanočestica može pokrenuti procese poput stvaranja biokorone, zatim svojstva tvari (kristaliničnost, oblik, alotropska modifikacija) mogu utjecati na biološki odgovor, te visoka sklonost aglomeraciji nanočestica može imati značajan utjecaj na njihov prijenos preko barijere placente. Uz to važno je isključiti bilo kakvu interferenciju nanočestica s *ex vivo* perfuzijskim modelom. Nedavno je pokazano da nanočestice mogu uzrokovati artefakte koji su bili povezani s aglomeratima čestica, funkcionalnošću i stabilnošću fluorescentnih oznaka. Do danas svaki laboratorij koristi vlastite prilagođene *ex vivo* perfuzijske protokole. Iako su mnogi parametri (primjerice, potrošnja glukoze, proizvodnja laktata, pH, potrošnja kisika) i referentne tvari (primjerice, antipirin, FITC-dekstran) opisani kako bi potvrdili integritet i vijabilnost tkiva, nema standardiziranog pristupa provođenju *ex vivo* perfuzijskih ispitivanja.

3.5.3. *In vivo* animalni modeli

Izlaganje gravidnih glodavaca nanofarmaceuticima može dati važne informacije o biodistribuciji nanočestica u živom organizmu, uključujući potencijalnu translokaciju prema fetusu. Međutim, placenta je organ koji se najviše razlikuje među vrstama. Iako placenta ima istu funkciju kod svih vrsta, postoje značajne razlike u razvoju placente, njezinoj građi, funkciji i patologiji između ljudi i glodavaca. Placentarna se barijera obično razvija približno 10.-12. dana gestacije u miša. Kod ljudi, placentarna barijera se razvija otprilike 4 mjeseca od gestacije. Anatomija i fiziologija ljudske placente je jedinstvena. Jedna važna razlika je da kod ljudi sinciotrofoblast nastaje spajanjem stanica

citotrofoblasta i tvori pravi sincicij bez lateralnih staničnih membrana, dok su kod štakora ili miševa prisutna tri sloja trofoblasta između kapilara majčine krvi i krvi fetusa. Stoga se učinkovitost prijenosa za ksenobiotike ili nanočestice kroz maternicu mora zasebno definirati za ljude (Wick i sur., 2010; Yamashita i sur., 2011).

Primjena podataka dobivenih na animalnim modelima na ljude predstavlja izazov i zahtijeva detaljnu procjenu. Međutim, dobivanje podataka o translokaciji nanolijekova kod trudne žene je vjerojatno moguće samo za određene lijekove za koje su dostupna neinvazivna klinička ispitivanja. U slučaju nanočestica, moguće je dobiti približnu procjenu predvidljive vrijednosti animalnih modela, uspoređujući prijenos istih nanočestica tijekom kasne gestacije kod životinja s rezultatima *ex vivo* perfuzijskih ispitivanja na modelu ljudske placente (Muoth i sur., 2016).

3.6. TRANSPLACENTARNI PRIJENOS NANOMATERIJALA

Iako recentne toksikološke studije pokazuju da nanočestice mogu imati štetne učinke na zdravlje, ne postoje slične informacije koje se odnose na trudnoću; malo se zna o prijenosu nanočestica prema krvotoku fetusa i učinak na fetus u razvoju. *In vivo* ispitivanja na animalnom modelu gravidnih glodavaca pokazuju da nanočestice zlata, titanijevog dioksida i kvantne točke mogu prijeći placentu i nakupiti se u fetusu ovisno o njihovoj veličini. Proučavana je šteta nastala na genitalnim i kranijalnim živcima kod potomaka. U usporedbi sa životinjskim modelom, studija koja je koristila nanočestice zlata u *ex vivo* perfuzijskom modelu ljudskog tkiva placente nije uspjela pokazati prijenos nanočestica u krvotok fetusa. Međutim, u drugoj studiji, u kojoj su korištene iste placentarne perfuzijske metode, fluorescentno označene polistirenske nanočestice su mogle prijeći placentu s majke na fetus, a njihov prijenos je ovisio o veličini. U obje studije na ljudima nije bilo utjecaja na održivost tkiva placente (Malek i Mattison, 2010).

Nanočestice kroz krvotok ulaze u placentu, endometrij, žumančanu vrećicu ili fetus, uzrokujući oksidativni stres i upalu. Takvi učinci dovode do disfunkcije placente, usporenog neonatalnog rasta, malformacija fetusa te neurotoksičnosti ili reproduktivne toksičnosti kod potomka. Upalni citokini

majke uzrokovani nanočesticama također ulaze u fetus i utječu na razvoj mozga fetusa (Li i sur., 2014).

Trudnoća i uspješna gestacija zahtijevaju brze promjene u krvnoj opskrbi maternice, rast i funkcionalne promjene specifične za makro- i mikrovaskularni dio kako bi podržali razvoj fetusa. Disfunkcija maternice na bilo kojem nivou može utjecati na razvoj i/ili zdravlje fetusa. Nadalje, razvoj placente, promjenjivog fetomaternalnog vaskularnog organa, ključna je tijekom uspješne gestacije. Moglo bi se činiti da protok krvi kroz placentu, nekarakteristično turbulentan u mikrovaskularnom okruženju, stvara uvjete za začepljenje, taloženje i zadržavanje nanočestica. Već je spomenuto da izloženost nanočesticama tijekom gestacije može dovesti do značajne mikrovaskularne disfunkcije u krvotoku fetusa ili majke. Nije jasno prenosi li se takva disfunkcija u odraslu dob i/ili stvara temelje za razvoj bolesti kod odraslih. S obzirom na dalekosežni potencijal takve mogućnosti, buduće studije i izvori moraju biti prošireni i povećani na predmetnom području (Stapleton i Nurkiewicz, 2014).

3.6.1. Utjecaj veličine nanočestica na placentarni prijenos

Najviše je poznato da veličina nanočestica ima važnu ulogu u placentarnoj translokaciji različitih vrsta nanočestica (Tablica 9). Gotovo sva ispitivanja pokazuju da je količina prenesenih nanočestica veća za male nego za velike nanočestice. Za male nanočestice čini se da njihov prijenos ovisi o sirovini od koje su izrađene. Translokacija nanočestica preko barijere placente znatno se razlikuje između primijenjenih uzoraka, osobito zbog razlika specifičnih za pojedinu vrstu (miševi, štakori, ljudi). To jasno pokazuje potrebu za standardiziranim protokolima ispitivanja prijenosa nanočestica preko barijere placente na istom eksperimentalnom modelu, a kako bi se rezultati mogli uspoređivati među različitim laboratorijima.

Potencijalni prolazi za prijenos nanočestica: preko slojeva trofoblasta i kroz njihove trofoblastne kanale unutar placente i (2) preko zida maternice i amnionske membrane. Hemokorijalne placente štakora imaju transtrofoblastne kanaliće promjera od oko 20-25 nm kroz slojeve trofoblasta II i III,

povezujući krv majke i fetusa kroz barijeru placente. Postoje uvjerljivi dokazi da su ti kanalići neprekidni i prisutni i kod ljudske placente (Semmler-Behnke i sur., 2014).

Tablica 9. Prijenos nanočestica kroz placentarnu barijeru ovisno o različitim veličinama.

Nanočestica	Model	Komentar	Referenca
Fluorescentno označene polistirenske nanočestice promjera 50, 80, 240, i 500 nm	Humani <i>ex vivo</i> perfuzijski model placente	Nanočestice promjera do 240 nm prolaze barijeru placente bez utjecanja na vijabilnost placente <i>ex vivo</i> .	(Wick i sur., 2010)
Ugljikove nanocjevčice promjera 20-30 nm i duljine 1-2 μ m	Intravenska primjena ugljikovih nanocjevčica gravidnim miševima	Stopa pobačaja ovisi o broju prethodnih trudnoća; kod prve trudnoće 70%, kod druge 40%, a kod četvrte 50%.	(Ema i sur., 2016; Qi i sur., 2014)
[¹⁴ C]C60: 2-10 nm	Intravenska primjena gravidnim štakoricama 15. dana gestacije, a štakoricama koje doje 8. dan nakon poroda	Najveći dio doze je akumuliran u jetri i plućima. Radioaktivnost se raširila na reproduktivni trakt, placentu i fetuse trudne jedinke. Kod štakorica koje su dojile, radioaktivnost se proširila na mlijeko te probavni sustav i jetru mladunčadi.	(Sumner i sur., 2010)
Nanočestice srebra: 50 nm	Intravenska primjena gravidnim mišicama jednom dnevno na 7., 8. i 9. dan gestacije	Nanočestice srebra proširile su se na većinu organa majke, ekstra-embriionalna tkiva i embrije, ali nisu se znatno nakupila na embrijima.	(Austin i sur., 2012)
Nanočestice srebra: 7,5 nm	Oralna primjenjena gravidnim štakoricama od 6.-19. gestacijskog dana	Ponavljajuće doze nanočestica srebra tijekom trudnoće uzrokuju oksidativni stres u tkivu jetre, ali ne uzrokuju razvojnu toksičnost.	(Yu i sur., 2014)
Fluorescentne polistirenske nanočestice: 50 nm i 100 nm	BeWo b30 stanična linija ljudske placente	Prijenos fluorescentnih polistirenskih nanočestica ovisi o veličini: manje čestice dolaze do fetalnog dijela u većoj mjeri.	(Cartwright i sur., 2012)

(nastavak)

Superparamagnetični željezov oksid: 20 nm (USPIO)	Mišice s komplikacijama u trudnoći su tretirane injekcijama kroz trbušnu šupljinu	Činjenica da USPIO nije utjecao na ishod trudnoće, pokazuje da bi takva metoda mogla biti sigurna za predviđanje ishoda rizičnih trudnoća.	(Girardi i sur., 2015)
Nanočestice silicija: 25 ili 50 nm	BeWo b30 stanična linija i <i>ex vivo</i> prokrvljena ljudska placenta	Potvrđeno je nakupljanje čestica u BeWo stanicama i u prokrvljenom tkivu placentе.	(Poulsen i sur., 2015)
TiO ₂ nanočestice: 25-70 nm	Gravidne mišice; potkožna primjena	Nanočestice su pronađene u mozgu i testisima 6 tjedana starog mužjaka miša. Nanočestice mogu oštetiti genitalni i kranijalni živčani sustav.	(Takeda i sur., 2009)
ZnO nanočestice: < 100 nm	Oralna primjena gravidnim i štakoricama u fazi laktacije	Jedinke izložene nanočesticama ZnO prije trudnoće, gestacije i laktacije pokazuju jasne indikacije za razvoj toksičnosti kod potomaka.	(Jo i sur., 2013)
Fluorescentno označene modificirane polistirenske nanočestice promjera od 20, 40, 100, 200 i 500 nm	<i>In vitro</i> trofoblastna stanična linija (3A-Sub-E) ili primarna kultura trofoblasta u terminu	Fluorescentne polistirenske čestice promjera do 500 nm prolaze barijeru placentе. Prijenos nanočestica kroz placentu je znatno povećan za nanočestice promjera 40 nm.	(Huang i sur., 2015)
Nanočestice poli (mliječne-ko-glikolne kiseline) s uklopljenim deksametazonom (140 do 298 nm)	BeWo b30 stanična linija	Veličina čestica je obrnuto proporcionalna s permeabilnošću uklopljenog lijeka. Rezultati naglašavaju mogućnost dizajniranja nanočestica koje mogu prenijeti lijek do fetusa.	(Ali i sur., 2013)

(nastavak)

Nanočestice silicija i titanovog dioksida (70 nm i 35 nm)	Intravenska primjena gravidnim mišićima	Nanočestice silicija i titanovog dioksida su određene u placenti, jetri i mozgu fetusa.	(Yamashita i sur., 2011)
¹⁹⁸ Au nanočestice: 1,4 nm (–20 mV), 18 nm (–22,8 mV) i 80 nm (–27,1 mV)	Intravenska primjena gravidnim mišićima na 18. dan gestacije	Nanočestice zlata prolaze barijeru placente. Translokacija nanočestica iz majčine krvi u fetus ovisi o veličini nanočestica.	(Semmler-Behnke i sur., 2014)
Nanočestice silicija označene fluoresceinom: 519 nm (–31,4 mV), 834 nm (–41,5 mV), ili 1000 nm (–53,2 mV)	Intravenska primjena gravidnim štakoricama	Veće nanočestice silicija (834 or 1000 nm) ne prelaze placentu; zadržavaju se u majčinom krvotoku; mogu poslužiti kao nosači lijekova od kojih treba zaštititi fetus.	(Refuerzo i sur., 2011)
Nanočestice željezovog oksida i silicija: 31 ili 40 nm; od –2,8 mV do –31,9 mV	<i>In vitro</i> BeWo b30 model stanične barijere placente	Nanočestice se mogu opsežno prenijeti preko modela barijere placente, ali njihova površinska svojstva značajno utječu na prijenos.	(Correia Carreira i sur., 2015)
Fluorescentno označen PAMAM dendrimer: 2-8 nm; –8,23 mV	<i>Ex vivo</i> model humane placente	PAMAM dendrimeri pokazuju nizak obim prijenosa kroz prokrvljenu ljudsku placentu.	(Menjoge i sur., 2011)
Fluorescentne CdTe/CdS kvantne točke (QD)	Intravenska primjena gravidnim mišićima Kvantne točke prolaze barijeru placente; obim prijenosa je obrnuto proporcionalan veličini i izravno proporcionalan primjenjenoj dozi	Kvantne točke prolaze barijeru placente; obim prijenosa je obrnuto proporcionalan veličini i izravno proporcionalan primjenjenoj dozi.	(Chu i sur., 2010)

3.6.2. Utjecaj površinskog naboja nanočestica na placentarni prijenos

Osim veličine nanočestica, njihov površinski naboj također može utjecati na prijenos preko barijere placente. Općenito, često se smatra da je manje vjerojatno da će se dogoditi unos u stanicu i translokacija negativno nabijenih nanočestica, nego neutralnih ili pozitivno nabijenih. Naime,

negativno nabijene nanočestice elektrostatski može odbiti negativno nabijena stanična membrana. Unatoč općenitoj pretpostavci da pozitivno nabijene nanočestice pokazuju veći obim translokacije nego negativno nabijene, prema dostupnim literaturnim navodima takva se opća pretpostavka ne može jednoznačno potvrditi (Tablica 10). Trebalo bi naglasiti da se indukcija naboja po funkcionalnosti nanočestica često veže uz promjene drugih svojstava površine; primjerice, hidrofobnosti/hidrofilnosti koji mogu utjecati na translokaciju nanočestica. Kako bi se riješio problem učinka naboja na translokaciju čestica, potrebno je provesti dodatna ispitivanja, uključujući i veću raznovrsnost nanočestica u takvim ispitivanjima (Muoth i sur., 2016).

Tablica 10. Ispitivanja prijenosa nanočestica kroz placentarnu barijeru ovisno o površinskom naboju.

Nanočestica	Model	Komentar	Referenca
Nanočestice zlata (13 nm) s različitim modifikacijama površine: feritin (–1,6 mV), PEG (–6,0 mV) i citrat (–17,0 mV).	Suspenzije nanočestica (184 µg/ml) su kroz repnu venu injicirane gravidnim mišicama.	Izloženost fetusa nanočesticama ovisi o stadiju embrionog/placentarnog sazrijevanja i sastavu površine nanočestica.	(Yang i sur., 2012)
Nanočestice željezovog oksida (28-30 nm) s pozitivnim (51 mV) ili negativnim (–52 mV) površinskim nabojem.	Jedna doza nasuprot više doza: 10 mg nanočestica/kg tjelesne mase (2,5 mg Fe/kg tjelesne mase) je intraperitonejski primjenjeno gravidnoj mišici tijekom gestacije.	Rezultati pokazuju da i pozitivno i negativno nabijene nanočestice željezovog oksida mogu prijeći placentu i nakupiti se u fetusu. Višestruke doze pozitivno nabijenih nanočestica primjenjenih kroz nekoliko dana rezultiraju znatnim povećanjem smrti fetusa i nakupljanjem željeza u jetri fetusa i placenti.	(Di Bona i sur., 2014)
Pozitivno (51 mV) i negativno nabijene (–55,5 ili –58,3 mV) polistirenske nanočestice slične veličine (50 nm)	BeWo b30 stanična linija	Translokacija polistirenskih nanočestica nije povezana s njihovim nabojem.	(Kloet i sur., 2015)

3.6.3. Utjecaj oblika nanočestica na prijenos preko barijere placente

Translokacija nanočestica ovisna o obliku do danas nije izravno procijenjena u smislu prijenosa preko barijere placente. Očekuje se da bi oblik mogao imati značajan utjecaj na značajke translokacije nanočestice. Iako je prijenos s majke na fetus promatran za sferične i cjevaste nanočestice, utjecaj oblika nanočestica na prijenos preko barijere placente i dalje ostaje prilično nepoznat. Sustavan pristup koji koristi točno definirane baze nanočestica s kontroliranim veličinama i oblicima mogao bi biti koristan u smislu razumijevanja prijenosa nanočestice preko barijere placente (Yang i sur., 2012).

3.6.4. Nanočestice koje ne prolaze barijeru placente i ne nakupljaju se u tkivu fetusa

Uobičajen problem za određivanje prijenosa nanočestica preko barijere placente je niska osjetljivost mnogih analitičkih metoda. Stoga analitičko dokazivanje odsutnosti prijenosa nanočestica predstavlja izazov. Međutim, razvojem novih analitičkih tehnika očekuje se pomicanje granica detekcije takvih specifičnih analita u prilično složenom analitičkom uzorku. Malobrojna ispitivanja pokazuju odsutnost translokacije nanočestice, a pregledno su prikazana tablicom 11. Takve nanočestice s uklopljenim lijekovima mogle bi imati značajan potencijal za liječenje bolesti trudnica, a bez učinka na fetus (Muoth i sur., 2016).

Tablica 11. Pregledni prikaz nanočestica za koje nije detektiran prijenos kroz barijeru placente i nakupljanje u tkivu fetusa.

Nanočestica	Model	Komentar	Referenca
Nanočestice kadmijevog oksida (15 nm)	Gravidne mišice su svaki drugi dan udisanjem bile izložene ili količini od 100 mg svježe generiranog CdO/m ³ (izloženost 1), ili svaki dan količini od 230 mg CdO/m ³ (izloženost 2).	Iako bi rezultati izmjereni na duljini od tjemena do trtice fetusa mogli sugerirati prijenos Cd kroz placentu do fetusa, Cd nije izmjeren u kasnijim stadijima fetusa.	(Blum i sur., 2012)

(*nastavak*)

PEGilirane nanočestice zlata (15 i 30 nm)	Prokrvljena ljudska placenta	U modelu otvorene perfuzije nanočestice su primijećene kod majke ali ne i kod fetusa, što pokazuje odsutnost placentarnog prijenosa. Tijekom 6 h recirkulacijske perfuzije, nisu primijećene čestice u krvotoku fetusa.	(Myllynen i sur., 2008)
Nanočestice titanovog dioksida (< 100 nm)	Mišice su (C57BL/6BomTac) 1 h/dnevno udisanjem bile izložene aerosoliziranom prahu u količini od 42 mg/m ³ na gestacijske dane 8.-18.	Majčina upala pluća koja je uslijedila nakon udisanja nanočestica titanovog dioksida možda je rezultirala križnim placentalnim prijenosom upalnih citokina. Postnatalni prijenos se možda dogodio kroz majčino mlijeko, iako titanijev dioksid nije pronađen u mlijeku nekoliko dana po porodu.	(Hougaard i sur., 2010)

Bez sustavnih ispitivanja koja koriste nanočestice koje se razlikuju u samo jednoj značajki (korištenjem tzv. knjižnice nanočestica), neće biti moguće postići shvaćanje utjecaja pojedine značajke nanočestica u smislu prijenosa preko barijere placente. S ciljem značajnog unaprijeđenja znanja o tome kako značajke nanočestica utječu na njihov prijenos preko barijere placente, potrebno je deskriptivna ispitivanja zamijeniti mehanističkim ispitivanjima prijenosa nanočestica koje se razlikuju u veličini, obliku ili površinskim svojstvima. Osim shvaćanja kako značajke nanočestica utječu na placentarni prijenos, važno je dobiti opsežan uvid u mehanizme koji su temelj tog prijenosa.

S obzirom da brojni ispitivani inhibitori različitih placentarnih prijenosnika nisu imali značajan utjecaj na translokaciju nanočestica, moguće je zaključiti da se translokacija nanočestica odvija pasivnom difuzijom. Međutim, pored ispitivanja inhibitora različitih placentarnih prijenosnika, nisko specifični prijenosnici i kanali mogu pomoći u otkrivanju novih načina translokacije nanočestica kroz placentarnu barijeru. Nadalje, nove analitičke metode detekcije treba uzeti u obzir za buduća

ispitivanja s ciljem postizanja veće osjetljivosti detekcije nanočestica te točnih i kvantitativnih rezultata ispitivanja prijenosa nanočestica (Mouth i sur.,2016).

Također važan aspekt prijenosa nanočestica preko barijere placente je stvaranje biokorone. Naime, u biološkom okruženju nanočestice će odmah biti obložene koronom različitih biomolekula, a što će imati veliki utjecaj na njihovo biološko ponašanje. Pokazano je da količina i vrsta biomolekula koje grade biokoronu na površini nanočestica ovise o svojstvima nanočestica. Stoga je važno razumijeti kako se biokorona stvara i modificira tijekom translokacije nanočestica preko barijere placente, osobito pri razvoju nanofarmaceutika koji specifično ciljaju određeno tkivo placente ili fetusa.

Konačno, translokacija nanočestica ovisi i o različitim stadijima trudnoće. U prvom tromjesečju, placentarna je barijera jako debela kako bi zaštitila embrio u razvoju, i postaje tanja pred porod kada je potrebna značajna količina hranjivih tvari za rast fetusa. Javlja se potreba za razvojem humanih modela za ispitivanja prijenosa nanočestica u ranoj trudnoći. Iako je *ex vivo* perfuzija placente u prvom tromjesečju tehnički izvediva, nije baš privlačna metoda zbog ograničenog pristupa tkivu placente. Idealni eksperimentalni model placentarnog prijenosa bi zapravo imao sljedeće osobine: primjereni kapacitet za ispitivanje velikih skupina nanočestica, prikladnost za mehanističke studije prijenosa nanočestica, mogućnost ispitivanja produljenog vremena izlaganja nanočesticama i dobra korelacija s prijenosom nanočestica u realnim uvjetima *in vivo* i različitim stadijima trudnoće (Muoth i sur., 2016).

3.7. MODELI ZA PREDVIĐANJE PRIJENOSA NANOČESTICA U LJUDSKO MLIJEKO

Istraživanja pokazuju da se nanomaterijali distribuiraju u različita tkiva i organe (primjerice, u tkivo dojke ili mlijeko jedinki tijekom laktacije) (Stapleton i Nurkiewicz, 2014).

3.7.1. *In vitro* modeli za određivanje M/P omjera

Metoda ravnotežne dijalize izravno procjenjuje M/P omjer. Valja naglasiti da je u takvim pokusima korištena rekonstituirana vakuumirana smrznuta plazma i hrana u prahu za dojenčad. Kao i kod drugih metoda koji uzimaju u obzir samo pasivne procese određivanja koncentracije lijeka u mlijeku,

nedostatak takve metode je izostanak aktivnih procesa prijenosa. Metoda ravnotežne dijalize za utvrđivanje M/P omjera *in vitro* ima i druge metodološke nedostatke; primjerice, stabilnost mliječne masti nakon smrzavanja ili tijekom dijalize, zadržavanje mliječne masti u sustavu dijalize, pH gradijent između mlijeka i plazme.

Difuzijska metoda može se koristiti neovisno o pH vrijednosti mlijeka i plazme, nevezanim frakcijama u obranom mlijeku i plazmi. Međutim, kao i za izravnu procjenu M/P omjera, takva metoda neće funkcionirati kad se uključe aktivni procesi. Još jedan korak bi bio predvidjeti omjer M/P iz fizičko-kemijskih značajki molekule djelatne tvari, što se opet može lako izmjeriti ili predvidjeti na temelju strukture takve tvari. Stoga uvažavanje pH razlike mlijeka i plazme te pK_a vrijednost djelatne tvari uključuju druga dva čimbenika koji mogu utjecati na sposobnost molekule da prijeđe lipidni dvosloj: molekularna težina i koeficijent raspodjele $\log P$. Koristeći regresijsku analizu omjera M/P i fizičko-kemijske parametre za 20 kiselih lijekova i 15 baznih lijekova, određene su sljedeće jednadžbe:

Za kisele lijekove:
$\log M/P = 2,068 - 0,162\sqrt{M_w} - 0,185 \log P \text{ (kisele lijekovi)}$
Za bazne lijekove:
$\log M/P = 0,265 - 0,153 \log P - 0,128 \log U/D \text{ (bazni lijekovi)}$

gdje je U/D omjer nedisociranog (neioniziranog) prema disociranom (ioniziranom) lijeku. Međutim, moguće je koristiti veze između vezanja proteina mlijeka i plazme i mlijeka: koeficijent ultrafiltracije $f_{u,p}$ i $f_{u,m}$ i $\log P$, a prema jednadžbi:

$$M/P_{phase} = f_{u,p} \times M_u/P_u \left[\left(0,955/f_{u,m} \right) + \left(0,045 \times \text{lipidi mlijeka} P_{app} \right) \right]$$

gdje se $f_{u,m}$ i $f_{u,p}$ odnose na nevezane frakcije lijeka u mlijeku i plazmi, M_u/P_u je omjer nevezane koncentracije lijeka u mlijeku i plazmi predviđen Henderson-Hasselbachovom jednačbom, a lipid mlijeko P_{app} je $C_{lipid}/C_{ultrafiltrate}$. Nadalje:

$$\log mlijekoP_{app} = 1,29 \log octP_{app} - 0,88$$

Takav model distribucije faza je rezultirao malim precjenjivanjem omjera M/P za kisele lijekove i podcjenjivanjem omjera M/P za bazne lijekove. Razlozi takvih odstupanja nisu do kraja istraženi.

3.7.2. Modeli temeljeni na stanicama

Do sad, modeli temeljeni na stanicama (npr. mišje CIT₃stanice) ne reflektiraju omjer M/P. Metoda je dovoljno osjetljiva da pokaže da će aktivni procesi prijenosa biti važni za određeni spoj i mogla bi biti dovoljna za poticanje daljnjih *in vivo* pokusa kako bi se odredili M/P omjeri za takve potencijalno problematične lijekove.

3.7.3. *In vivo* animalni modeli

U općenitom farmakokinetikom smislu, animalni modeli slabo reflektiraju raspodjelu lijekova kod ljudi. Vrste se razlikuju po metabolizmu lijekova, vezanju lijekova na proteine plazme i eliminaciji lijekova putem bubrega. Ispitivanja prijenosa lijekova u mlijeko su također otežana zbog različitog udjela proteina i lipida u mlijeku, a što se razlikuje među pojedinim vrstama. Često korišteni animalni modeli (poput štakora i kunića) proizvode mlijeko s puno višim udjelom lipida i proteina nego što sadrži humano mlijeko. Stoga se apsolutni M/P omjer kod navedenih vrsta može znatno razlikovati od humanog. Ipak, takvi životinjski modeli imaju svoj značaj u predmetnom području. Animalni model kunića je korišten kako bi se potvrdili rezultati difuzijskog modela za niz eksperimentalnih molekula djelatne tvari. Kao što postoje razlike između ljudi i životinja u farmakokinetici i M/P omjeru, tako postoje i razlike među životinjskim vrstama. Rasprave o *in vitro* i *in vivo* modelima sugeriraju da nijedan model neće točno procijeniti M/P omjer ili izloženost dojenčeta za sve djelatne tvari.

Primjerena kombinacija svih opisanih pristupa moguće bi bila korisna za predviđanje prijenosa lijeka u mlijeko u ljudi.

3.7.4. Modeli izloženosti

Krajnji cilj u određivanju M/P omjera je predvidjeti izloženost ljudskog dojenčeta ksenobioticima kroz majčino mlijeko. Doza u ljudskom mlijeku se može izračunati kao:

$$DOZA = C_p^{ss} \times \frac{M}{P \times V_{mlijeko}}$$

gdje je C_p^{ss} prosječna koncentracija kod uobičajenog stanja u majčinoj plazmi, M/P je omjer AUC vrijednosti u obje tekućine, a $V_{mlijeko}$ je volumen mlijeka koje dojenče popije, što iznosi u prosjeku 150 ml/kg/dan. Ako se zna klirens dojenčeta (Cl_n) ili se može predvidjeti, prosječna sistemska izloženost dojenčeta se može izračunati kao:

$$C^{ss} = \left(\frac{DOZA}{Cl_n} \right) / \tau$$

Predviđanje točne doze u mlijeku i izloženosti dojenčeta je teško, jer se razlikuje i učestalost dojenja u odnosu na majčino doziranje, kao i volumen mlijeka konzumiran u pojedinom podoju. Međutim, gore navedene metode omogućuju procjenu hoće li dojenče biti izloženo dozi lijeka koja će biti potencijalno farmakološki aktivna ili toksična (Fleishaker, 2003).

3.7.5. Prijenos nanočestica u mlijeko

Nanočestice grafenovog oksida (GO) (prosječna lateralna veličina 200 nm, debljina GO nanolistova približno 1,8 nm) pokazale su mnoge negativne učinke na razvoj mladunčadi miševa u razdoblju laktacije. Povećanje tjelesne mase, duljine tijela i repa kod mladunčadi miševa koji su izloženi GO nanočesticama u dozi od 0,8 mg po svakom mišu svaki dan u razdoblju laktacije su bili značajno usporeni (Fu i sur., 2015).

4. RASPRAVA

Tijekom posljednjeg desetljeća, nanotehnologija se uvelike koristi u području biomedicine i zdravstva, uključujući biološka otkrića, suvremene oblike lijekova, dijagnostiku i tkivno inženjerstvo. Primjena nanotehnologije u biomedicini rezultirala je značajnim poboljšanjem pojedinih terapijskih i dijagnostičkih postupaka. Procijenjuje se da je broj nanotehnoloških patenata povezan s biomedicinom i zdravstvom povećan s manje od 200 iz 2000. godine na gotovo 10 000 do 2010. godine, udvostručujući se gotovo svake tri godine u promatranom periodu (Barkalina i sur., 2014).

Nanotehnologija se bavi materijalima i sustavima čije strukture i komponente pokazuju nova i znatno poboljšana fizička, kemijska i biološka svojstva. Veličina nanotehnoloških sustava je u području od 10^{-9} do 10^{-7} metara. Nanočestice služe kao karika u veličini koja nedostaje između bioloških objekata veličine mikrona (npr. žive stanice) i terapijskih molekula (veličine 10^{-10} metara) (Refuerzo i sur., 2011). Primjerice, nanovektori imaju potencijal ciljane dostave lijeka na određeno mjesto u tijelu, na temelju njihovih fizičko-kemijskih i geometrijskih značajki ili specifičnih liganda za receptore eksprimirane na ciljanom tkivu. Prijenosnici lijekova bazirani na nanočesticama s velikim omjerom površine i volumena mogu biti funkcionalizirani različitim ligandima u svrhu postizanja ciljanog učinka (Hafner i sur., 2014). Prijenosnici lijekova bazirani na nanočesticama imaju značajan potencijal kontrole i upravljanja njihovim prijenosom preko barijere placentе, pritom osiguravajući nove načine selektivnog liječenja majke ili fetusa, odnosno komplikacija vezanih uz placentu.

S obzirom da nanočestice imaju fizičko-kemijska svojstva drugačija od svojih analoga normalne veličine, a zbog njihove izrazito male veličine i velike površine, posebno je potrebno procijeniti njihovu toksičnost i štetne učinke na zdravlje. Posebno se netopljivi nanočestični nosači mogu nakupljati u tkivu ili organima. Stoga je nužno navesti i potencijalne zdravstvene i sigurnosne implikacije nanomaterijala korištenih u nanomedicini (Zhao i Castranova, 2011).

Unatoč značajnoj kliničkoj potrebi za poboljšanim sustavima primjene lijekova u smislu postizanja ciljanog učinka uz istodobno sigurnu primjenu, u području patologije trudnoće nije odobren za primjenu niti jedan lijek koji se temelji na nanotehnologiji i koji bi na osnovu toga značajno

unaprijedio ishode liječenja uz istodobno poboljšani sigurnosni profil i ciljani učinak djelatne tvari

Tablicom 12. su pregledno prikazani nanolijekovi odobreni za primjenu na području Europske unije s naglaskom na njihov sigurnosni profil tijekom trudnoće i dojenja.

Tablica 12. Pregledni prikaz nanolijekova odobrenih za primjenu u Europskoj uniji s posebnim naglaskom na posebna upozorenja, mjere opreza i kontraindikacije za primjenu tijekom trudnoće i dojenja (izrađeno prema Hafner i sur. 2014. i korištenjem dostupne baze lijekova Europske agencije za lijekove).

Naziv lijeka/oblik	Lijek/nanotehnološki oblik	Glavna indikacija	Lijek korišten u trudnoći/dojenju
Rapamune®/tablete	Sirolimus/ Nanokristali	Preveniji odbacivanja presatka; Transplatacije bubrega	Ispitivanja na životinjama pokazala su reproduktivnu toksičnost. Ne primjenjuju se u trudnoći i dojenju.
Tricor®/Lipanthyl®/Lipidil®/tablete	Fenofibrat/ Nanočestice	Hiperkolesterolemija	Pokusima na životinjama nisu dokazani teratogeni učinci. Uočeni su embriotoksični učinci pri visokim dozama koje izazivaju maternalnu toksičnost. Ne primjenjuju se u trudnoći i dojenju.
Emend®/kapsule	Aprepitant/ Nanokristali	Postoperativne mučnine i povraćanja	Istraživanja na životinjama nisu ukazala na izravno ili neizravno štetno djelovanje na trudnoću, embriofetalni razvoj, okot niti postnatalni razvoj. Ne primjenjuju se u trudnoći i dojenju.
Neoral®/meke kapsule	Ciklosporin/ Nanoemulzija	Prevenija odbacivanja presatka organa	Ispitivanja na životinjama pokazala su reproduktivnu toksičnost u štakora i zečeva. Iskustva sa Sandimmun Neoralom u trudnica su ograničena. Trudnice koje primaju ciklosporin, izložene su riziku prijevremenog poroda (<37tjedna). Ciklosporin prelazi u majčino mlijeko. Ne primjenjuju se u trudnoći i dojenju.
Norvir®/meke kapsule	Ritonavir/ Nanoemulzija	HIV infekcije	Primjena ritonavira u trudnoći smije se razmotriti samo ako očekivana korist nadmašuje rizik za plod. Ne zna se izlučuje li se u mlijeko. Žene zaražene HIV-om ne smiju dobiti svoju djecu zbog opasnosti prijenosa virusa.

(nastavak)

Renagel®/tablete	Sevelamer/ Polimer	Hiperfosfatemija, Bubrežna dijaliza	U istraživanjima na životinjama nije bilo dokaza da sevelamer uzrokuje embriofetalnu toksičnost. Sigurnost primjene u trudnica i dojlja nije ustanovljena.
Zypadhera®/ Suspenzija za injekciju	Olanzapine/ Nanokristali	Shizofrenija	Ne primjenjuju se u trudnoći i dojenju.
Xeplion®/ Suspenzija za injekciju	Paliperidone/ Nanokristali	Shizofrenija	Ne primjenjuju se u trudnoći i dojenju.
Oncaspar®/ otopina za injekciju	Pegaspargase/ Polimer-protein konjugat	Akutna limfoblastična leukemia	Ne primjenjuju se u trudnoći i dojenju.
Somavert®/ otopina za injekciju	Pegvisomant / Polimer-protein konjugat	Akromegalija	Ne primjenjuju se u trudnoći i dojenju.
PegIntron®/ otopina za injekciju	Peginterferon alpha-2b/ Polimer-protein konjugat	Hepatitis C, kronični	Ne primjenjuju se u trudnoći i dojenju. Istraživanja na životinjama pokazala reproduktivnu toksičnost i za muškarce i za žene.
Pegasys®/ otopina za injekciju	Peginterferon alpha-2a/ Polimer-protein konjugat	Hepatitis B, Hepatitis C, kronični	Nedovoljno dokaza za sigurnu primjenu lijeka tijekom trudnoće i dojenja.
Neulasta®/ otopina za injekciju	Pegfilgrastim/ Polimer-protein konjugat	Kemoterapijom inducirana (febrilna) neutropenia	Nedovoljno dokaza za sigurnu primjenu lijeka tijekom trudnoće i dojenja.
Cimzia™/ otopina za injekciju	Certolizumab pegol/ Polimer-protein konjugat	Reumatoidni artritis	Zbog inhibicije TNFα Cimzia primijenjena tijekom trudnoće može utjecati na imunološki odgovor novorođenčeta. Stoga se ne preporučuje primjenjivati u trudnoći. Kod dojenja nema dovoljno dokaza za sigurnu primjenu.
Mircera®/ otopina za injekciju	Metoksipolietilen glikol- epoetin beta/ Polimer-protein konjugat	Anemija kod kronične bolesti bubrega	Nema podataka o primjeni lijeka u trudnica i dojlja.
DepoCyt®/ otopina za injekciju	Cytarabine/ Liposom	Intratekalno liječenje limfomatoznog meningitisa	Ne preporuča se primjena tijekom trudnoće i dojenja.
Caelyx®/ otopina za injekciju	Doksorubicin/ Liposom	Karcinom dojke, karcinom jajnika Multipli mijelom, Kaposijev sarkom	Ne smije se primjenjivati tijekom trudnoće i dojenja.

(nastavak)

Myocet®/ otopina za injekciju	Doksorubicin/ Liposomi	Karcinom dojke	Ne smije se primjenjivati tijekom trudnoće i dojenja
Mepact®/ otopina za injekciju	Mifamurtide/ Liposomi	Osteosarkom	Nema podataka o primjeni mifamurtida kod trudnica. Ispitivanja na životinjama su nedostatna za konačni zaključak o reproduktivnoj toksičnosti. Mifamurtid se ne preporučuje koristiti tijekom trudnoće niti u žena reproduktivne dobi koje ne koriste učinkovitu kontracepciju. Ne preporučuje se tijekom dojenja zbog nedostatka podataka.
Visudyne®/ otopina za injekciju	Verteporfin/ Liposomi	Senilna makularna degeneracija te kod patološke kratkovidnosti	Ne preporučuje se u trudnoći. Ne bi se trebao primjenjivati tijekom dojenja ili je dojenje potrebno prekinuti nakon primjene na 48 sati.
Abraxane®/ otopina za injekciju	Paklitaksel/ nanočestice	Karcinom dojke	Ne primjenjivati u trudnoći, kontraindiciran u dojenju. Žene reproduktivne dobi kontracepcija 1 mjesec, a muškarci 6 mjeseci nakon terapije.
Zevalin®/ otopina za injekciju	⁹⁰ Y-ibritumomab tiuksetan/ Nanočestice	Folikularni limfom	Kontraindiciran je u trudnoći i dojenju. Žene i muškarci moraju koristiti kontracepciju tijekom i 12 mjeseci nakon završene terapije.

5. ZAKLJUČAK

Ljudski *in vitro* i *ex vivo* placentarni modeli pružaju višestruke pristupe za karakterizaciju prijenosa lijekova i metabolizam. Međutim, treba još istražiti jesu li trenutni modeli prikladni za istraživanje prijenosa nanočestičnih materijala kroz ljudsku placentarnu barijeru, a s obzirom da su takvi modeli razvijeni za ispitivanje prijenosa malih molekula.

Nanofarmaceutici imaju brojne prednosti; karakterizira ih djelotvornost uz smanjenu učestalost nuspojava, omogućuju ciljanu personaliziranu terapiju, njihovom primjenom smanjena je učestalost doziranja.

Ispitivanje nanofarmaceutika u trudnoći bazira se na primjeni specifičnih modela koji sadržavaju određene manjkavosti, a budući da nije opravdano ispitivanja izvoditi na trudnicama i dojiljama. Razvoj novih terapija u trudnoći temeljenih na nanočesticama zahtijeva razumijevanje mehanizama placentarnog prijenosa nanočestica. Rasvijetljavanje kako značajke nanočestica poput veličine, oblika, kemijskog sastava i ciljanih liganda utječu na placentarno nakupljanje, translokaciju i biološke učinke od iznimne je važnosti za razvoj novih terapijskih nanosustava s ciljem preferencijalnog liječenja majke, fetusa ili poremećaja placentе.

U trudnoći nije još indiciran niti jedan nanofarmaceutik odobren za terapijsku primjenu na području Europske unije.

6. LITERATURA

1. Ali, H., Kalashnikova, I., White, M.A., Sherman, M., Rytting, E., 2013. Preparation, characterization, and transport of dexamethasone-loaded polymeric nanoparticles across a human placental in vitro model. *Int J Pharm* 454, 149-157.
2. Andrade, S.E., Gurwitz, J.H., Davis, R.L., Chan, K.A., Finkelstein, J.A., Fortman, K., McPhillips, H., Raebel, M.A., Roblin, D., Smith, D.H., Yood, M.U., Morse, A.N., Platt, R., 2004. Prescription drug use in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 191, 398-407.
3. Antoine Malek i Donald R Mattison (2010) Drug development for use during pregnancy: impact of the placenta. *Expert Rev. Obstet Gynecol* 5(4), 437-454.
4. Audus, K.L., 1999. Controlling drug delivery across the placenta. *Eur J Pharm Sci* 8, 161-165.
5. Austin, C.A., Umbreit, T.H., Brown, K.M., Barber, D.S., Dair, B.J., Francke-Carroll, S., Feswick, A., Saint-Louis, M.A., Hikawa, H., Siebein, K.N., Goering, P.L., 2012. Distribution of silver nanoparticles in pregnant mice and developing embryos. *Nanotoxicology* 6, 912-922.
6. Axelsdottir, T.O., Sigurdsson, E.L., Gudmundsdottir, A.M., Kristjansdottir, H., Sigurdsson, J.A., 2014. Drug use during early pregnancy: Cross-sectional analysis from the Childbirth and Health Study in Primary Care in Iceland. *Scand J Prim Health* 32, 139-145.
7. Barkalina, N., Charalambous, C., Jones, C., Coward, K., 2014. Nanotechnology in reproductive medicine: emerging applications of nanomaterials. *Nanomedicine* 10, 921-938.
8. Bernick, S.J., Kane, S., 2012. Drug transfer to the fetus and to the breastfeeding infant: what do we know? *Curr Drug Deliv* 9, 350-355.
9. Blum, J.L., Xiong, J.Q., Hoffman, C., Zelikoff, J.T., 2012. Cadmium associated with inhaled cadmium oxide nanoparticles impacts fetal and neonatal development and growth. *Toxicol Sci* 126, 478-486.
10. Cartwright, L., Poulsen, M.S., Nielsen, H.M., Pojana, G., Knudsen, L.E., Saunders, M., Rytting, E., 2012. In vitro placental model optimization for nanoparticle transport studies. *Int J Nanomedicine* 7, 497-510.

11. Ceckova-Novotna, M., Pavek, P., Staud, F., 2006. P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function. *Reprod Toxicol* 22, 400-410.
12. Chu, M., Wu, Q., Yang, H., Yuan, R., Hou, S., Yang, Y., Zou, Y., Xu, S., Xu, K., Ji, A., Sheng, L., 2010. Transfer of quantum dots from pregnant mice to pups across the placental barrier. *Small* 6, 670-678.
13. Correia Carreira, S., Walker, L., Paul, K., Saunders, M., 2015. The toxicity, transport and uptake of nanoparticles in the in vitro BeWo b30 placental cell barrier model used within NanoTEST. *Nanotoxicology* 9 Suppl 1, 66-78.
14. Di Bona, K.R., Xu, Y., Ramirez, P.A., DeLaine, J., Parker, C., Bao, Y., Rasco, J.F., 2014. Surface charge and dosage dependent potential developmental toxicity and biodistribution of iron oxide nanoparticles in pregnant CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 50, 36-42.
15. Ema, M., Hougaard, K.S., Kishimoto, A., Honda, K., 2016. Reproductive and developmental toxicity of carbon-based nanomaterials: A literature review. *Nanotoxicology* 10, 391-412.
16. Erdeljić Turk, V., Huić, M. 2014. Primjena lijekova u žena koje doje. Francetić, I., Vitezić, D. *Klinička farmakologija*. Zagreb: Medicinska naklada str. 303-306.
17. Fleishaker, J.C., 2003. Models and methods for predicting drug transfer into human milk. *Adv Drug Deliver Rev* 55, 643-652.
18. Fu, C., Liu, T., Li, L., Liu, H., Liang, Q., Meng, X., 2015. Effects of graphene oxide on the development of offspring mice in lactation period. *Biomaterials* 40, 23-31.
19. Girardi, G., Fraser, J., Lennen, R., Vontell, R., Jansen, M., Hutchison, G., 2015. Imaging of activated complement using ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) - conjugated vectors: an in vivo in utero non-invasive method to predict placental insufficiency and abnormal fetal brain development. *Mol Psychiatr* 20, 1017-1026.
20. Hafner, A., Lovric, J., Lakos, G.P., Pepic, I., 2014. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *Int J Nanomedicine* 9, 1005-1023.
21. Hougaard, K.S., Jackson, P., Jensen, K.A., Sloth, J.J., Loschner, K., Larsen, E.H., Birkedal, R.K., Vibenholt, A., Boisen, A.M., Wallin, H., Vogel, U., 2010. Effects of prenatal exposure

- to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. Part Fibre Toxicol 7, 16.
22. Huang, J.P., Hsieh, P.C.H., Chen, C.Y., Wang, T.Y., Chen, P.C., Liu, C.C., Chen, C.C., Chen, C.P., 2015. Nanoparticles can cross mouse placenta and induce trophoblast apoptosis. Placenta 36, 1433-1441.
 23. Ito, S., 2000. Drug therapy for breast-feeding women. N Engl J Med 343, 118-126.
 24. Ito, S., Lee, A., 2003. Drug excretion into breast milk - Overview. Adv Drug Deliver Rev 55, 617-627.
 25. Jo, E., Seo, G., Kwon, J.T., Lee, M., Lee, B., Eom, I., Kim, P., Choi, K., 2013. Exposure to zinc oxide nanoparticles affects reproductive development and biodistribution in offspring rats. J Toxicol Sci 38, 525-530.
 26. Kloet, S.K., Walczak, A.P., Louisse, J., van den Berg, H.H., Bouwmeester, H., Tromp, P., Fokkink, R.G., Rietjens, I.M., 2015. Translocation of positively and negatively charged polystyrene nanoparticles in an in vitro placental model. Toxicol In Vitro 29, 1701-1710.
 27. Knipp, G.T., Audus, K.L., Soares, M.J., 1999. Nutrient transport across the placenta. Adv Drug Deliver Rev 38, 41-58.
 28. Lacroix, I., Damase-Michel, C., Lapeyre-Mestre, M., Montastruc, J., 2000. Prescription of drugs during pregnancy in France. Lancet 356, 1735-1736.
 29. Lawrence, R.M., Lawrence, R.A., 2011. Breastfeeding: More Than Just Good Nutrition. Pediatr Rev 32, 267-280.
 30. Li, Y., Zhang, Y., Yan, B., 2014. Nanotoxicity overview: nano-threat to susceptible populations. Int J Mol Sci 15, 3671-3697.
 31. Lupattelli, A., Spigset, O., Twigg, M.J., Zagorodnikova, K., Mardby, A.C., Moretti, M.E., Drozd, M., Panchaud, A., Hameen-Anttila, K., Rieutord, A., Juraski, R.G., Odalovic, M., Kennedy, D., Rudolf, G., Juch, H., Passier, A., Bjornsdottir, I., Nordeng, H., 2014. Medication use in pregnancy: a cross-sectional, multinational web-based study. Bmj Open 4.
 32. Malm, H., Martikainen, J., Klaukka, T., Neuvonen, P.J., 2003. Prescription drugs during pregnancy and lactation - a Finnish register-based study. Eur J Clin Pharmacol 59, 127-133.

33. McManaman, J.L., Neville, M.C., 2003. Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliver Rev* 55, 629-641.
34. Menjoge, A.R., Rinderknecht, A.L., Navath, R.S., Faridnia, M., Kim, C.J., Romero, R., Miller, R.K., Kannan, R.M., 2011. Transfer of PAMAM dendrimers across human placenta: prospects of its use as drug carrier during pregnancy. *J Control Release* 150, 326-338.
35. Muoth, C., Aengenheister, L., Kucki, M., Wick, P., Buerki-Thurnherr, T., 2016. Nanoparticle transport across the placental barrier: pushing the field forward! *Nanomedicine (Lond)* 11, 941-957.
36. Myllynen, P.K., Loughran, M.J., Howard, C.V., Sormunen, R., Walsh, A.A., Vahakangas, K.H., 2008. Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reprod Toxicol* 26, 130-137.
37. Poulsen, M.S., Mose, T., Maroun, L.L., Mathiesen, L., Knudsen, L.E., Rytting, E., 2015. Kinetics of silica nanoparticles in the human placenta. *Nanotoxicology* 9, 79-86.
38. Qi, W., Bi, J., Zhang, X., Wang, J., Liu, P., Li, Z., Wu, W., 2014. Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times. *Sci Rep* 4, 4352.
39. Refuerzo, J.S., Godin, B., Bishop, K., Srinivasan, S., Shah, S.K., Amra, S., Ramin, S.M., Ferrari, M., 2011. Size of the nanovectors determines the transplacental passage in pregnancy: study in rats. *Am J Obstet Gynecol* 204, 546 e545-549.
40. Sachs, H.C., Drugs, C., 2013. The Transfer of Drugs and Therapeutics Into Human Breast Milk: An Update on Selected Topics. *Pediatrics* 132, E796-E809.
41. Semmler-Behnke, M., Lipka, J., Wenk, A., Hirn, S., Schaffler, M., Tian, F., Schmid, G., Oberdorster, G., Kreyling, W.G., 2014. Size dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat. *Part Fibre Toxicol* 11, 33.
42. Shaikh AK, Kulkarni MD. 2013. Drugs in pregnancy and lactation. *Int J Basic Clin Pharmacol* 2:130-135.
43. Stapleton, P.A., Nurkiewicz, T.R., 2014. Vascular distribution of nanomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 6, 338-348.

44. Sumner, S.C., Fennell, T.R., Snyder, R.W., Taylor, G.F., Lewin, A.H., 2010. Distribution of carbon-14 labeled C60 ([¹⁴C]C60) in the pregnant and in the lactating dam and the effect of C60 exposure on the biochemical profile of urine. *J Appl Toxicol* 30, 354-360.
45. Takeda, K., Suzuki, K.I., Ishihara, A., Kubo-Irie, M., Fujimoto, R., Tabata, M., Oshio, S., Nihei, Y., Ihara, T., Sugamata, M., 2009. Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can Damage the Genital and Cranial Nerve Systems. *J Health Sci* 55, 95-102.
46. Vahakangas, K., Myllynen, P., 2009. Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Brit J Pharmacol* 158, 665-678.
47. Vitezić, D. 2014. Primjena lijekova u trudnoći Francetić, I., Vitezić, D. Klinička farmakologija, Zagreb: Medicinska naklada str. 295-302
48. Volpe, D.A., 2008. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *J Pharm Sci-U.S.* 97, 712-725.
49. Werler, M.M., Mitchell, A.A., Hernandez-Diaz, S., Honein, M.A., Prevention, N.B.D., 2005. Use of over-the-counter medications during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 193, 771-777.
50. Wick, P., Malek, A., Manser, P., Meili, D., Maeder-Althaus, X., Diener, L., Diener, P.A., Zisch, A., Krug, H.F., von Mandach, U., 2010. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect* 118, 432-436.
51. Yamashita, K., Yoshioka, Y., Higashisaka, K., Mimura, K., Morishita, Y., Nozaki, M., Yoshida, T., Ogura, T., Nabeshi, H., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., Monobe, Y., Imazawa, T., Aoshima, H., Shishido, K., Kawai, Y., Mayumi, T., Tsunoda, S., Itoh, N., Yoshikawa, T., Yanagihara, I., Saito, S., Tsutsumi, Y., 2011. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol* 6, 321-328.
52. Yang, H., Sun, C., Fan, Z., Tian, X., Yan, L., Du, L., Liu, Y., Chen, C., Liang, X.J., Anderson, G.J., Keelan, J.A., Zhao, Y., Nie, G., 2012. Effects of gestational age and surface modification on materno-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy. *Sci Rep* 2, 847.
53. Young, A.M., Allen, C.E., Audus, K.L., 2003. Efflux transporters of the human placenta. *Adv Drug Deliver Rev* 55, 125-132.

54. Yu, W.J., Son, J.M., Lee, J., Kim, S.H., Lee, I.C., Baek, H.S., Shin, I.S., Moon, C., Kim, J.C., 2014. Effects of silver nanoparticles on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. *Nanotoxicology* 8 Suppl 1, 85-91.
55. Zaki, N.M., Albarraq, A.A., 2014. Use, attitudes and knowledge of medications among pregnant women: A Saudi study. *Saudi Pharm J* 22, 419-428.
56. Zhao, J., Castranova, V., 2011. Toxicology of nanomaterials used in nanomedicine. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 14, 593-632.

7. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Viktorija Tokić, mag. pharm. (rođ. Džalto)

Datum i mjesto rođenja: 12.09.1981., Split

Adresa: Nova cesta 178, Zagreb

E-mail: viki.dzalto@gmail.com

ZAPOSLENJE:

Ljekarne zagrebačke županije, M. Magdalenića 1, Velika Gorica 2006. – sada

ŠKOLOVANJE:

II. gimnazija, Križanićeva 4, Zagreb 1996. – 2000.

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, A. Kovačića 1, Zagreb 2000. – 2005.

ČLANSTVO:

Hrvatska ljekarnička komora